



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Branislav Lj. Apostolović

**POVEZANOST VARIJACIJA U GENU ZA *KLOTHO* PROTEIN,
PARAMETARA MINERALNO-KOŠTANOG METABOLIZMA I
EHOKARDIOGRAFSKIH KARAKTERISTIKA
KOD BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2022.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE

Branislav Lj. Apostolović

**THE INTERRELATIONSHIP BETWEEN *KLOTHO* PROTEIN
GENE VARIATIONS, MINERAL BONE METABOLISM AND
ECHOCARDIOGRAPHIC CHARACTERISTICS IN
HEMODIALYSIS PATIENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2022.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

Prof. dr Tatjana Cvetković, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Naslov:

Povezanost varijacija u genu za *Klotho* protein, parametara mineralno-koštanog metabolizma i ehokardiografskih karakteristika kod bolesnika na hemodijalizi

Rezime:

Poremećaj mineralno-koštanog metabolizma ima značajnu ulogu u etiopatogenezi kardiovaskularnih događaja bolesnika na hemodijalizi. Poslednjih godina otkriveni su novi parametri koje utiču na homeostazu mineralnog metabolizma, kao što su fibroblastni faktor rasta 23 (FGF23) i *Klotho* protein. Cilj istraživanja je ispitivanje povezanosti varijacija u genu za *Klotho* protein, parametara mineralno-koštanog metabolizma i hipertrofije leve komore (HLK) kod bolesnika na hemodijalizi.

Istraživanjem je obuhvaćeno 142 bolesnika kod kojih je izvršena genotipizacija za *Klotho* G-395A i *Klotho* C1818T polimorfizme, određene su koncentracije standardnih (kalcijuma, fosfora, PTH i alkalne fosfataze) i novih (*Klotho* protein, FGF23 i vitamina D) parametara mineralno-koštanog metabolizma i urađen ehokardiografski pregled. Dizajnirani su modeli za utvrđivanje prediktivne moći varijacija u genu za *Klotho* protein i parametara mineralno-koštanog metabolizma za nastanak HLK. Praćeno je petogodišnje preživljavanje.

Nosioci A alela *Klotho* G-395A polimorfizma, u poređenju sa nosiocima G alela, su značajno duže na hemodijalizi ($p=0,033$), značajno mlađi su započeli hemodijalizno lečenje ($p=0,044$), a imaju sniženu koncentracije *Klotho* proteina ($p=0,001$) i povišene koncentracije FGF23 ($p=0,031$) i fosfora ($p=0,016$). Najbolja predikcija za nastanak HLK je postignuta dodavanjem sva tri nova parametra mineralno-koštanog metabolizma i *Klotho* G-395A polimorfizma; *AUC* je pokazala značajno poboljšanje sa 0,569 na 0,806 ($p < 0,001$) i poboljšanje u reklasifikacije pacijenata za 82,1% (95% CI 42,9-121,3%). Tokom pet godina praćenja stopa mortaliteta je iznosila 52,1%. Kod 47,3% preminulih neposredni uzrok smrti je bio kardiovaskularni događaj.

Utvrđen je značaj *Klotho* G-395A polimorfizma, jer nosioci A alela imaju bržu progresiju hronične bubrežne slabosti, smanjene koncentracije *Klotho* proteina i povišene FGF23 i fosfora, što sugeriše da su izloženi povećanom riziku od kardiovaskularnih događaja. Pokazan je prediktivni značaj novih parametara mineralno-koštanog metabolizma u nastanku HLK, kao i u predikciji mortaliteta. Poznavanje varijacija u genu za *Klotho* protein doprinosi personalizovanom pristupu, što uz primenu adekvatnih terapijskih mera i postupaka teži poboljšanju kvaliteta života i dužem preživljavanju bolesnika na hemodijalizi.

Naučna oblast:

Medicinske nauke - medicina

Naučna
disciplina:

Interna medicina, biohemija

Ključne reči:

Klotho, FGF23, vitamin D, polimorfizam, hemodijaliza, hipertrofija leve komore, preživljavanje

UDK:

616.61-78:616.71-008:577.122(043.3)

CERIF
klasifikacija:

B 560 urologija, nefologija

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Prof. dr Tatjana Cvetković, full professor, Faculty of Medicine, University of Niš

Title:

The interrelationship between *Klotho* protein gene variations, mineral bone metabolism and echocardiographic characteristics in hemodialysis patients

Abstract:

Mineral bone metabolism disorder plays a major role in the etiopathogenesis of cardiovascular events in hemodialysis patients. In recent years, many new parameters associated with the homeostasis of mineral bone metabolisms, such as fibroblast growth factor 23 (FGF23) and *Klotho* protein, have been discovered. The main goal of this study is to discover interrelationships between *Klotho* protein gene variations, mineral bone metabolism, and left ventricular hypertrophy (LVH) in hemodialysis patients.

The study included 142 patients who were genotyped for G-395A and C1818T *Klotho* gene polymorphism. Laboratory analyses were performed for routine parameters of mineral bone metabolism (calcium, phosphorus, parathyroid hormone, and alkaline phosphatase) and new parameters (FGF23, *Klotho*, and vitamin D) and echocardiographic examination. Models for the determination of predictive capabilities of *Klotho* gene variations and parameters of mineral bone metabolism for the development of LVH were designed. The five-year survival rate was monitored.

Carriers of A-allele of the G-395A *Klotho* gene polymorphism, compared to non-A-allele carriers, are significantly longer on chronic hemodialysis program ($p=0.033$), started renal replacement therapy at an earlier stage of life ($p=0.044$), have decreased concentration of *Klotho* protein ($p=0.01$), have increased concentration of FGF23 ($p=0.031$) and phosphorus ($p=0.016$). The best prediction for the development of LVH was reached by adding all three new parameters of mineral bone metabolism and *Klotho* G-395A polymorphism; AUC has shown significant improvement from 0.596 to 0.806 ($p < 0.001$), and an improvement in patient reclassifications for 82.1% (95% CI 42.9–121.3%). During the five-year follow-up, the mortality rate was 52.1%, where 46.6% had cardiovascular complications as a direct cause of death.

The G-395A *Klotho* polymorphism is determined due to faster progression of chronic kidney disease in A-allele carriers, decreased concentration of *Klotho* protein, and increased concentration of FGF23 and phosphorus, which suggest that they have a higher risk for the development of cardiovascular complications. This research has shown the prediction power of the new parameters of mineral bone metabolism for the development of LVH and mortality. Knowledge of *Klotho* gene variations contributes to the personalised management of patients, which, alongside the application of adequate therapeutic means and procedures, increases the quality of life and more prolonged survival of the hemodialysis patients.

Scientific Field:

Medical sciences - medicine

Scientific
Discipline:

Internal medicine, biochemistry

Key Words:

Klotho, FGF23, vitamin D, polymorphism, hemodialysis, left ventricular hypertrophy, survival

UDC:

616.61-78:616.71-008:577.122(043.3)

CERIF
Classification:

B560 urology, nephrology

Creative
CommonsLicense
Type:

CC BY-NC-ND

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije

1. **Doc. dr Branka Mitić**, predsednik i član
2. **Prof. dr Tatjana Cvetković**, mentor i član
3. **Prof. dr Svetlana Apostolović**, član
4. **Doc. dr Nikola Stefanović**, član
5. **Doc. dr Tamara Jemcov**, član sa Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane _____

ZAHVALNICA

Iako doktorska disertacija predstavlja originalan i lični rad pojedinca, njena izrada zahteva učešće i pomoć velikog broja ljudi, stoga veliku zahvalnost dugujem svima koji su dali svoj doprinos za nastanak ovog rada.

Najveću zahvalnost iskazujem svom mentoru, prof. dr Tatjani Cvetković, na znanju, studioznosti, posvećenosti i upornosti koje je uložila u ovaj rad, bez kojih ne bi bilo moguće ostvariti postavljene ciljeve, ali i na podršci, poverenju i prijateljstvu.

Veliku zahvalnost dugujem ostalim članovima komisije: doc. dr Branki Mitić, prof. dr Svetlani Apostolović, doc. dr Nikoli Stefanoviću i doc. dr Tamari Jemcov na datim sugestijama i predlozima za završnu obradu, kao i učešću u oceni ove disertacije.

Zahvaljujem se lekarima, medicinskim sestrama i laboratorijskim tehničarima Klinike za nefrologiju UKC Niš na podršci i pomoći prilikom izrade ove disertacije, uz posebnu zahvalnost dr sc. med. Karolini Paunović za pomoć pri selekciji bolesnika.

Veliku zahvalnost za pomoć u različitim fazama eksperimentalnog dela istraživanja dugujem kolegama sa Instituta za biohemiju i iz Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu, posebno dr sc. Žaklini Šmelcerović, dr Stevanu Vujiću, uz posebnu zahvalnost dr sc. Slavoljubu Živanoviću. Doc. dr Nikoli Stefanoviću iskazujem veliku zahvalost na neprocenjivoj pomoći, izdvojenom vremenu i korisnim savetima, pogotovo tokom esperimentalnog dela istraživanja.

Prof. dr Svetlani Apostolović se zahvaljujem na velikom zalaganju pri izradi ehokardiografske studije za ovo istraživanje. Zahvaljujem se doc. dr Aleksandri Ignjatović i asist. dr Mariji Anđelković Apostolović na stručnoj pomoći u statističkoj obradi podataka. Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Dušici Pavlović, rukovodiocu projekta III41018, bez čije finansijske podrške ovo istraživanje ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem se svojim kolegama u Kliničko bolničkom centru Zemun koji su me podržali i motivisali u svakodnevnom radu, pogotovo dr sc. med. Jovani Kušić Miličević na nesebičnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Na kraju, hvala mojoj porodici na pruženom strpljenju, veri i ljubavi, a svakako najveću i neizmernu zahvalnost iskazujem Mariji i Petri za безусловnu podršku, za odricanje, razumevanje i oslonac sve ove godine, kao i za neiscrpnu energiju i snagu da sve što započnem i završim.

U Beogradu, 17. jun 2022.

Branislav Apostolović

***Istraživanje je podržano od strane Ministarstva prosvete,
nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru projekata III41018***

LISTA KORIŠĆENIH SKRAĆENICA

ACEi	inhibitor angiotenzin-konvertujućeg enzima
ADAM	dezintegrini i metaloproteinaze (od engl. <i>a disintegrin and metalloproteinase domain-containing proteins</i>)
ADHR	autozomno dominantni hipofosfatemijski rahitis
ALP	alkalna fosfataza
ALT	alanin aminotransferaza
ARHR	autozomno recesivni hipofosfatemijski rahitis
AST	aspartat aminotransferaza
AT1	bolokator receptora angiotenzina II
ATP	adenozin trifosfat
AUC	površina ispod krive (od engl. <i>Area Under the Curve</i>)
Ca	kalcijum
CaP	kalcijum-fosfat
CaSR	kalcijum senzitivni receptor
CI	interval poverenja (od engl. <i>confidence interval</i>)
CIT	citoplazmatski
CKD-MBD	poremećaj mineralno-koštanog metabolizma u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji (od engl. <i>chronic kidney disease - mineral and bone disorder</i>)
CPP	čestice kalciproteina (od engl. <i>calciprotein particles</i>)
CRP	C-reaktivni protein
CVE	kardiovaskularni događaj (od engl. <i>cardiovascular event</i>)
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
ERK 1/2	signalni put (od engl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>).
ESA	eritropoetin stimulirajući agensi
ESKD	završni stadijum bubrežne bolesti (od engl. <i>end stage kidney disease</i>)
FEP	frakciona ekskrecija fosfata
FGF23	fibroblastni faktor rasta 23
FGFR	receptor za fibroblastni faktor rasta
FoxOs	(od engl. <i>forkhead box protein O</i>)
FTC	porodična tumorska kalcinoza
GGT	gama-glutamil transferaza
HBI	hronična bubrežna insuficijencija
HD	hemodijaliza
HDL	lipoprotein velike gustine (od engl. <i>high-density lipoprotein</i>)
HIF1a	hipoksijom indukovani faktor 1a
HLK	hipertrofija leve komore
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi (od engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HR	odnos rizika (od engl. <i>hazard ratio</i>)
hs-CRP	visoko senzitivni C-reaktivni protein (od engl. <i>High-Sensitivity C-Reactive Protein</i>)
I / R	ishemijsko-reperfuzione povrede
IDI	integrisani indeks diskriminacije (od engl. <i>integrated discrimination index</i>)
Ig	imunoglobulin

IGF-1	insulinu sličan faktor rasta 1 (od engl. <i>insulin growth factor 1</i>)
IL	interleukin
IS	indoksil sulfat
ISO	izoproterenol
JGF	jačina glomerularne filtracije
kDa	kilodalton
KVB	kardiovaskularne bolesti
LDL	lipoprotein niske gustine (od engl. <i>low-density lipoprotein</i>)
LP	leva pretkomora
mIMCD3	kultura mišjih ćelija (od engl. <i>innermedulla collecting duct3</i>)
MMP-9	matriks metaloproteinaza 9 (od engl. <i>matrix metalloproteinase 9</i>)
MnSOD	mangan superoksid dismutaze
mRNA	informacijska ribonukleinska kiselina
NaPT	natrijum zavisni transporteri fosfata (od engl. <i>Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters</i>)
NFAT	nuklearni factor aktivacije T ćelija (od engl. <i>nuclear factor of activated T cells</i>)
NF-κB	nuklearni faktor κB
NO	azot-monoksid
NRI	indeks reklasifikacije mreže (od engl. <i>net reclassification index</i>)
NT-proBNP	N terminalnio pro natriuretski peptid tipa B (od engl. <i>N-terminal pro b-type natriuretic peptide</i>)
P	fosfor
PCR	lančana reakcija polimeraze
PCR-CTPP	uporedna lančana reakcija polimeraze sa dva para prajemra (engl. <i>polymerase chain reaction - confronting 2-pair primers</i>)
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
PTH	paratireoidni hormon
PTHR	receptora za paratiroidni hormon
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteron sistem
RBA	receptor vezujuća nit (od engl. <i>receptor- binding arm</i>)
ROC	od engl. <i>receiver operating characteristic curve</i>
ROMK1	kalijumski kanali (od engl. <i>renal outer medullary potassium channel 1</i>).
RVK	reaktivne vrste kiseonika
SA	sinoatrijalni
SG	standardna greška
SNP	pojedinačni nukleotidni polimorfizmi (od engl. <i>single nucleotide polymorphisms</i>)
TAC	aortna stenoza (od engl. <i>transverse aortic constriction</i>)
THCs	ukupni kalcifikacioni skor srca (od engl. <i>Total Heart Calcification score</i>)
TM	transmembranski
TNFα	faktor nekroze tumora-alfa
TRPV	katijonski kanali za kalcijum (od engl. <i>transient receptor potential vallinoidl</i>)
VDR	vitamin D receptor
XLH	X povezana hipofosfatemija (od engl. <i>X-Linked Hypophosphatemia</i>)
βMHC	teški lanac miozina beta (od engl. <i>β myosin heavy chain</i>)

LISTA SLIKA

- Slika 1** | Stadijumi hronične bubrežne insuficijencije na osnovu vrednosti JGF i stepena albuminurije
- Slika 2** | Regulacija metabolizma kalcijuma i fosfata pomoću vitamina D i PTH
- Slika 3** | Formiranje kompleksa FGF23 – *Klotho* – FGFR1c
- Slika 4** | Membranski i rastvorljivih (odcepljeni i izlučenih) *Klotho* (a), FGF23 vezan za kompleks membranski *Klotho* i FGFR (b)
- Slika 5** | Regulatorne funkcije solubilnih *Klotho* proteina
- Slika 6** | FGF23 – *Klotho* endokrinska osovina
- Slika 7** | CPP-posredovana infamacija i vaskularna oštećenja
- Slika 8** | *Klotho* protein i kardiovaskularne bolesti
- Slika 9** | Kardioprotektivni efekti *Klotho* protein
- Slika 10** | Parametri mineralno-koštanog metabolizma i progresije HBI
- Slika 11** | Spirala pogoršanja *Klotho* ekspresije
- Slika 12** | Lokacija *Klotho* gena homanog genotipa
- Slika 13** | Struktura *Klotho* gena
- Slika 14** | Fotografija 2% agaroznom gelu, nakon horizontalne elektroforeze za detekciju SNP *Klotho* G-395A
- Slika 15** | Fotografija 2% agaroznom gelu, nakon horizontalne elektroforeze za detekciju SNP *Klotho* C1818T

LISTA GRAFIKONA

- Grafikon 1** | Starosna struktura ispitivanih grupa
- Grafikon 2** | Distribucija ispitanika prema polu
- Grafikon 3** | Distribucija osnovne bolesti kod bolesnika na hemodijalizi
- Grafikon 4** | Distribucija različitih tipova geometrije leve komore
- Grafikon 5** | Distribucija ukupnog kalcijumskog skora (THCs)
- Grafikon 6** | Korelaciona analiza *Klotho* proteina i dijaliznog staža
- Grafikon 7** | Korelaciona analiza *Klotho* proteina i fosfora
- Grafikon 8** | Korelaciona analiza FGF23 i fosfora
- Grafikon 9** | Korelaciona analiza FGF23 i CaxP
- Grafikon 10** | Korelaciona analiza vitamina D i CRP
- Grafikon 11** | Korelaciona analiza *Klotho* proteina i vitamina D
- Grafikon 12** | ROC kriva različitih kombinacija klasičnih i novih parametara monerano-koštanog metabolizma i SNP *Klotho* G-395A za nastanak hipertrofije leve komore
- Grafikon 13** | Kaplan-Maier-ova kriva ukupnog preživljavanja u petogodišnjem period
- Grafikon 14** | Kaplan-Maier-ova kriva kardiovaskularnog preživljavanja u petogodišnjem period
- Grafikon 15** | Kaplan- Maier-ova kriva preživljavanja u odnosu na distribuciju genotipova *Klotho* G-395A
- Grafikon 16** | Kaplan-Maier-ova kriva preživljavanja u odnosu na distribuciju genotipova *Klotho* C1818T
- Grafikon 17** | Kaplan- Maier-ova kriva u odnosu na hipertrofiju levog srca
- Grafikon 18** | Kaplan- Maier-ova kriva u odnosu na THC skor

LISTA TABELA

Tabela 1. Biohemijski parametri bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

Tabela 2. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

Tabela 3. Novi parametri mineralno-koštanog metabolizma bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

Tabela 4. Učestalost genotipova i alela polimorfizama *Klotho G-395A* kod bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

Tabela 5. Učestalost genotipova i alela polimorfizama *Klotho C1818T* kod bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

Tabela 6. Sociodemografski parametri kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho G-395A* polimorfizma

Tabela 7. Biohemijski parametri kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho G-395A* polimorfizma

Tabela 8. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho G-395A* polimorfizma

Tabela 9. Novi parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho G-395A* polimorfizma

Tabela 10. Sociodemografski parametri kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho C1818T* polimorfizma

Tabela 11. Biohemijski parametri kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho C1818T* polimorfizma

Tabela 12. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho C1818T* polimorfizma

Tabela 13. Novi parametri mineralno koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho C1818T* polimorfizma

Tabela 14. Ehokardiografske karakteristike kod bolesnika na hemodijalizi

Tabela 15. Sociodemografski parametri kod bolesnika sa i bez hipertrofije leve komore

Tabela 16. Biohemijski parametri kod bolesnika na hemodijalizi sa i bez hipertrofije leve komore

Tabela 17. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika na hemodijalizi sa i bez hipertrofije leve komore srca

Tabela 18. Novi parametri mineralno koštanog metabolizma kod bolesnika na hemodijalizi sa i bez hipertrofije leve komore srca

Tabela 19. Distribucija genotipove i alele *Klotho G-395A* i *Klotho C1818T* polomorfizma kod bolesnika sa i bez hipertrofijom leve komore

Tabela 20. Korelacioni koeficijent između *Klotho* proteina i kliničko biohemijskih parametara

Tabela 21. Korelacioni koeficijent između FGF23 i kliničko biohemijskih parametara

Tabela 22. Korelacioni koeficijent između vitamina D i kliničko biohemijskih parametara

Tabela 23. Korelacioni matriks novih parametara mineralno koštanog metabolizma

Table 24. Performanse prediktivnih modela za nastanak hipertrofije leve komore kod bolesnika na hemodijalizi

Tabela 25. Preživljavanje bolesnika tokom ispitivanog perioda

Tabela 26. Klinički i biohemijski parametri ispitanika prema smrtnom ishodu

Tabela 27. Standardni parametri mineralno koštanog metabolizma ispitanika prema smrtnom ishodu

Tabela 28. Novi parametri mineralno koštanog metabolizma ispitanika prema smrtnom ishodu

Tabela 29. Distribucija genotipova *Klotho* proteina u odnosu na smrtni ishod

Tabela 30. Preživljavanje u odnosu na distribuciju genotipova ispitivanih *Klotho* polimorfizama

Tabela 31. Preživljavanje u odnosu na prisustvo hipertrofije leve komore srca

Tabela 32. Preživljavanje u odnosu na THC skor

Tabela 33. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost– univarijantna logistička regresiona analiza kliničkih i biohemijskih parametara

Tabela 34. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost– univarijantna logistička regresiona analiza parametara mineralno koštanog metabolizma

Tabela 35. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost– univarijantna logistička regresiona analiza novih parametara

Tabela 36. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost–model multivarijantne logističke regresione analize

Tabela 37. Coxova regresiona analiza za kardiovaskularnu smrtnost–model multivarijantne logističke regresione analize

SADRŽAJ

1. UVOD	18
2. PREGLED LITERATURE	21
2.1. HRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA	22
2.2. KOMPLIKACIJE HRONIČNE BUBREŽNE INSUFICIJENCIJE	24
2.3. MINERALNO - KOŠTANI METABOLIZAM	27
2.3.1. ULOGA FGF23 / KLOTHO U REGULACIJI METABOLIZMA KACIJUMA I FOSFATA	30
2.3.2. STRUKTURA KLOTHO PROTEINA	32
2.3.3. BILOŠKA ULOGA KLOTHO PROTEINA.....	33
2.3.4. FGF23 - KLOTHO ENDOKRINA OSOVINA	36
2.3.5. REGULACIJA EKSPRESIJE FGF23 I KLOTHO	38
2.4 FOSFAT I STARENJE.....	40
2.4.1. ČESTICE KALCIPROTEINA KAO POSREDNICI OŠTEĆENJA IZAZVANOG FOSFATIMA.....	41
2.5. KLOTHO NEDOSTATAK I RIZIK ZA KARDIOVASKULARNE BOLESTI	45
2.6. KLOTHO PROTEIN I HIPERTROFIJA LEVE KOMORE	47
2.7.1. PRIMARNI POREMEĆAJI FGF23 – KLOTHO ENDOKRINE OSOVINE	49
2.7.2. MINERALNO-KOŠTANI METABOLIZAM I PROGRESIJA BUBREŽNE SLABOSTI	50
2.8. POLIMORFIZAM KLOTHO GENA	54
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	58
4. PACIJENTI I METODE ISTRAŽIVANJA	61
4.1. PACIJENTI	62
4.2. METODE	63
4.2.1. Rutinske laboratorijske metode	63
4.2.2. Određivanje koncentracije Klotho proteina.....	63
4.2.3. Određivanje koncentracije fibroblastnog faktora rasta 23.....	63
4.2.4. Određivanje koncentracije vitamin D na HPLC-u	64

4.3. Izolacija DNK	64
4.3.1. Metoda genotipizacije SNP G395A u genu za Klotho protein.....	64
4.3.2. Metoda genotipizacije SNP C1818T u genu za Klotho protein	66
4.4. EHOKARDIOGRAFSKI PREGLED	66
4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	67
4.5.1. Snaga studije i veličina uzorka	67
4.5.2. Statistička analiza	67
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	69
5.1. Opšte karakteristike ispitivane populacije.....	70
5.2. Rezultati bolesnika na hemodijalizi u poređenju sa kontrolnom grupom.....	72
5.3. Ispitivanje učestalosti genotipova i alela Klotho genskih polimorfizama.....	75
5.3.1. Klotho G-395A polimorfizam kod bolesnika na hemodijalizi	76
5.3.2. Klotho C1818T polimorfizam kod bolesnika na hemodijalizi	79
5.4. Morfologija leve komore srca kod bolesnika na hemodijalizi	82
5.4.1. Morfologija leve komore kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na genotipove i alele Klotho genskih polimorfizama.....	86
5.5. Korelacija i regresija novih parametara mineralno koštanog metabolizma	87
5.6. Prediktivna vrednost parametara mineralno-koštanog metabolizma za nastanak hipertrofije leve komore	93
5.7. Analiza preživljavanja.....	96
6. DISKUSIJA	107
6.1. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika na hemodijalizi	108
6.2. Novi parametri mineralno-koštanog metabolizma i varijacije u genu za Klotho protein kod bolesnika na hemodijalizi.....	112
6.3. Značaj parametara mineralno-koštanog metabolizma za hipertrofiju leve komore kod bolesnika na hemodijalizi.....	116
6.4. Uticaj parametara mineralno-koštanog metabolizma i ispitivanih Klotho polimorfizama na preživljavanje kod bolesnika na hemodijalizi	124
7. ZAKLJUČCI.....	127
8. REFERENCE.....	130
BIOGRAFIJA AUTORA.....	151

1. UVOD

Hronična bubrežna insuficijencija (HBI) predstavlja veliki medicinski i socio-ekonomski problem u svetu. Broj bolesnika koji zahtevaju zamenu bubrežne funkcije je u porastu, pri čemu je hemodijaliza (HD) najzastupljeniji metod lečenja u većini zemalja [1, 2]. Kod bolesnika na hemodijalizi se javljaju brojne komplikacije, a najznačajnije su anemija, hipertenzija, neuhranjenost i poremećaj mineralno-koštanog metabolizma [2]. Mineralno-koštani poremećaj u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji sa promenama u metabolizmu vitamina D i paratireoidnog hormona (PTH), dovodi do taloženja kalcijuma i fosfora u mekim tkivima. Pomenute promene udružene sa mikroinflamacijom i oksidativnim stresom, dovode do degradacije vaskularnih glatkomišićnih ćelija, sa strukturnim i funkcionalnim promenama na krvnim sudovima i srcu. Sve ovo dalje vodi smanjenju elastičnosti krvnih sudova, smanjenju koronarne perfuzije, remodelovanju leve komore srca, do kardiomiopatije i srčane slabosti. Negativni efekti na kardiovaskularni sistem utiču na kvalitet života i stopu preživljavanja bolesnika na hemodijalizi [3, 4].

Visoka stopa smrtnosti bolesnika na hemodijalizi je uglavnom posledica kardiovaskularnih događaja u čijoj etiopatogenezi značajnu ulogu ima poremećaj mineralno-koštanog metabolizma. U mineralno-koštanom metabolizmu postoji stalna interakcija između bubrega, paratireoidnih žlezdi, gastrointestinalnog trakta i kostiju. Istraživanja mineralno-koštanog metabolizma dovela su do otkrivanja novih komponenti u ovim kompleksnim patofiziološkim mehanizmima, a to su fibroblastni faktor rasta 23 (FGF23) i *Klotho* protein [5, 6]. Najnovija saznanja ukazuju da FGF23 i *Klotho* protein imaju značajnu ulogu u regulaciji metabolizma kalcijuma i fosfora, vitamina D i paratireoidnog hormona, pogotovo kod bolesnika sa HBI. Hronična bubrežna insuficijencija se smatra prirodnim modelom ubrzanog starenja, jer propadanjem bubrežnog tkiva dolazi do smanjene ekspresije *Klotho* proteina, FGF23 se smanjenim afinitetom vezuje za FGF receptor (FGFR), smanjuje se ekskrecija fosfata, što pokreće kaskadu nepovoljnih efekata na većem broju organa i sistema, a kao posledicu imamo porast neželjenih kardiovaskularnih događaja [7, 8].

Buduća proučavanja povezanosti standardnih i novih komponenti mineralno-koštanog metabolizma sa kardiovaskularnim morbiditetom i mortalitetom dovešće do dodatnih saznanja i omogućiti bolju stratifikaciju faktora rizika.

Proučavanje varijacija u genu za *Klotho* protein doprineće personalizovanom medicinskom pristupu, što bi uz primenu adekvatnih terapijskih mera i postupaka uticalo na poboljšanje kvaliteta života i duže preživljavanje bolesnika sa hroničnom bubrežnom slabošću na dijalizi.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. HRONIČNA BUBREŽNA INSUFICIJENCIJA

Hronična bubrežna insuficijencija (HBI) nastaje kao posledica delovanja heterogenih bolesti koje vremenom ireverzibilno oštećuju funkciju i/ili strukturu bubrega. Najbolji raspoloživi pokazatelj bubrežne funkcije je jačina glomerularne filtracije (JGF) koja pokazuje količinu filtrirane tečnosti kroz funkcionalne nefrone po jedinici vremena [9]. Definicija HBI se menjala tokom vremena, ali aktuelne međunarodne preporuke ovo stanje definišu kao smanjenu funkciju bubrega izraženo jačinom glomerularne filtracije (JGF) manjom od 60 ml/min/1,73 m² ili prisustvom markera oštećenja bubrega najmanje 3 meseca, bez obzira na osnovni uzrok. Marker oštećenja bubrega su: albuminurija, abnormalan sediment urina, elektrolitni poremećaji usled oštećenja tubula, patohistološke abnormalnosti, strukturne nepravilnosti utvrđene radiološkim metodama i istorija transplantacije bubrega. Uobičajena podela HBI je na pet stadijuma, uz postojanje 3a i 3b stadijuma [10]. Kada je JGF manja od 15 ml/min/1,73m² (stadijum 5), bolesnik je u završnom stadijumu bubrežne bolesti (ESKD, od engl. *end stage kidney disease*), pri čemu funkcija bubrega više nije u stanju da zadovolji životne potrebe duži vremenski period. Stoga bolesnici u *ESKD* zahtevaju početak lečenja nekom od metoda zamene bubrežne funkcije, (hemodijalizu ili peritoneumsku dijalizu, transplantaciju bubrega) ili konzervativni tretman (palijativna – nedijalizna nega).

				Odnosu albumin/kreatinin u urinu (mg/g)		
				A1	A2	A3
				Normalno / blaže povećanje <30	Umereno povećanje 30-300	Značajno povećanje >00
JGF ml/min/1,73 m ²	1	Normalno	>90	1 sa HBI-om	1	2
	2	Blago oštećenje	60-89	1 sa HBI-om	1	2
	3a	Blago do umereno oštećenje	45-59	1	2	3
	3b	Umereno do značajno oštećenje	30-44	2	3	3
	4	Značajno oštećenje	15-29	3	4	4
	5	Završni stadijum (ESRD)	<15	4	4	4

Slika 1 | Stadijumi hronične bubrežne insuficijencije na osnovu vrednosti JGF i stepena albuminurije - brojevi od 1-4 predstavljaju rizik od napredovanja HBI
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [11])

Brojna su ograničenja u proceni prevalencije HBI, poput korišćenje raličitih formula za izračunavanje JGF, metoda za detektovanja proteinurije i ispitivanja heterogenih populacija. Ipak procenjuje se da ona iznosi oko 11% u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju [12]. Šećerna bolest i hipertenzija su glavni uzroci hronične bubrežne insuficijencije u većini zemalja u svetu. Dijabetes kao osnovni uzrok je prisutan kod 30-50% osoba sa HBI, i pogađa 6,4% odraslih širom sveta, mada se očekuje da se taj broj poveća na 69% u zemljama sa visokim prihodima i na 20% u zemljama sa niskim i srednjim prihodima do 2030. Više od četvrtine odrasle populacije u 2000. godini je imalo hipertenziju. Predviđa se da će do 2025. godine taj udeo biti oko 60% [13]. U niskorazvijenim zemljama sveta glomerulonefritisi su vodeći uzroci HBI, a značajan procenat bolesnika je sa nepoznatim uzrokom bubrežne slabosti, ali i sa nefrotoksičnšću uzrokovanom biljnim lekovima, zagađenjem vode teškim metalima i zemljišta organskim jedinjenjima (pesticidima).

Postoji dosta monogenih i poligenih uzročnika hronične bubrežne insuficijencije. Neke bolesti dovode do urođenih poremećaja bubrega i mokraćnih puteva, koje se manifestuju na rođenju ili u ranom detinjstvu, a druge se uglavnom manifestuju kasnije u životu, kao što je autozomno dominantna policistična bolest bubrega [14]. Studije su identifikovale nekoliko lokusa, genskih polimorfizama tj. pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (SNP - od engl. *single nucleotide polymorphisms*) koji bi mogli doprineti ubrzanjoj progresiji HBI [15]. Smatra se da postoji i snažan uticaj okoline na predisponiranost za HBI. Epigenetski uticaj odnosi se na promene u transkripciji i ekspresiji gena koje se manifestuju u fenotipu, bez izmena u genotipu. Postoje značajni dokazi da inflamacija, oksidativni stres, uremija i hiperhomocisteinemija mogu izazvati promene u epigenomu koje podstiču fibrozu i mogu biti od značaja za progresiju HBI [16, 17].

Klinička slika HBI je raznolika. Mnogi bolesnici su asimptomatski ili imaju nespecifične simptome, poput mučnine, nagona na povraćanje, gubitka apetita, umora, malaksalosti ili pada koncentracije. Dijagnoza se obično postavlja nakon skrining testova (pregledom krvi i urina) ili kada su simptomi izraženi. Iako je najbolji raspoloživi pokazatelj bubrežne funkcije JGF, od

značaja za dijagnozu su prisustvo proteinurije i nalaz biopsije bubrega, sa promenama kao što su glomerulska skleroza, atrofija tubula ili intersticijska fibroza.

Praćenje bolesnika sa HBI podrazumeva identifikaciju nastalih poremećaja i njihovo lečenje, kao i kontrolu przine progresije bolesti, kao i procenu potrebe za započinjanjem zamene bubrežne funkcije, i adekvatnu pripremu za istu. Bolesnici sa HBI imaju pet do deset puta veći rizik od prerane smrti nego od progresije do završne faze bolesti bubrega. Ovaj povećani rizik od smrti raste eksponencijalno kako se funkcija bubrega pogoršava i u velikoj meri zavisi od pridruženog kardiovaskularnog morbiditeta [18, 19]. Takođe, i kvalitet života bolesnika sa HBI je značajno niži u odnosu na osobe u opštoj populaciji i opada sa smanjenjem JGF.

Većina bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne slabosti se leči hemodijalizom ili peritoneumskom dijalizom, sa prevalencijom na globalnom nivou od 280 na milion ljudi, u poređenju sa 65 bolesnika na milion ljudi koji imaju funkcionalni transplantirani bubreg. Petogodišnje preživljavanje bolesnika koji se leče dijalizom je 13% - 60% niže u poređenju sa u opštom populacijom sličnog uzrasta. Oko 56% bolesnika na dijalizi aktivno čeka na transplantaciju bubrega, samo 25% dobije bubreg, dok 6% umre dok čeka transplantaciju bubrega svake godine [19].

2.2. KOMPLIKACIJE HRONIČNE BUBREŽNE INSUFICIJENCIJE

Hronična bubrežna insuficijencija je povezana sa nekoliko negativnih kliničkih ishoda, kao što su kardiovaskularni događaji, prestanak rada bubrega, potreba za terapijom zamene bubrežne funkcije, povećana smrtnost i smanjen kvalitet života, što je posledica mnogobrojnih komplikacija koje prate ovu grupu bolesnika [20-24]. Neke od ovih komplikacija mogu se lako definisati i kvantifikovati, poput kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije, anemije, mineralno koštanih poremećaja, opterećenje volumenom, elektrolitne i acido-bazne abnormalnosti. Dok se ostale komplikacije mogu manje jasno definisati i imaju kompleksniju patogenezu (umor, kaheksija, pruritus, anoreksija, mučnina i seksualna disfunkcija). Komplikacije se uglavnom manifestuju udruženo, kao složeni klinički sindromi.

Hipertenzija je jedna od najčešće prisutnih komplikacija HBI i smatra se da doprinosi ubrzanom smanjenju bubrežne funkcije i kardiovaskularnom morbiditetu i mortalitetu. Dijagnostifikovanje i kontrola visokog krvnog pritiska su često suboptimalni [25]. Ciljne vrednosti sistolnog krvnog pritiska za bolesnike sa HBI su niže nego u opštoj populaciji [26].

Anemijske komplikacije kod bolesnika sa HBI su česte, i dobro proučene. Terapija podrazumeva primenu preparata gvožđa, a značajan pomak je učinjen uvođenjem eritropoetin stimulirajućih agenasa (ESA). Iako ESA preparati mogu da dovedu do simptomatskog olakšanja, uticaj ovih lekova na preživljavanje ostaje nejasan i može povećati rizik od kardiovaskularnih i malignih bolesti [27]. Vrše se veliki naponi svetske zajednice da ESA preparati, parenteralno gvožđe i transfuzija krvi budu dostupni u većini delova sveta.

Hipernatrijemija sa zadržavanjem tečnosti se često viđa kod bolesnika sa HBI, što doprinosi ne samo pojavi edema, već može negativno uticati na hipertenziju i kvalitet života. Povezuje se i sa kardiovaskularnim bolestima, posebno sa koncentričnom hipertrofijom leve komore, i posledičnom dijastolnom disfunkcijom.

Metabolička acidoza je uobičajena kod bolesnika sa HBI. Hronična metabolička acidoza doprinosi katabolizmu skeletnih mišića, neosetljivosti na endokrine hormone i koštanim abnormalnostima, te može ubrzati progresiju HBI [28, 29].

Mineralno-koštani poremećaj je redovni pratilac bolesnika sa HBI, obuhvata tradicionalne biohemijske abnormalnosti minerala, renalnu osteodistrofiju i kalcifikaciju mekih tkiva [30-32]. Hipertrofija leve komore može biti uzročno povezana sa ovim abnormalnostima. Ova složena grupa poremećaja je slabo razumljiva i uprkos velikom broju pretkliničkih podataka ima vrlo malu primenu u kliničkoj praksi [33]. Postoji mogućnost lečenja hiperfosfatemije, nedostataka vitamina D i sekundarnog hiperparatiroidizama, iako ne postoje relevantni dokazi koji potvrđuju korist od ovakvih terapijskih intervencija. Uloga jeftinih vezača fosfata na bazi kalcijuma je kontroverzna, zbog potencijalne opasnosti ovih preparata u taloženju kalcijuma u mekim tkivima [34, 35].

Kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju vodeći uzrok smrtnosti kod bolesnika sa HBI, a prevalencija i njihova težina se povećavaju sa padom JGF [36, 37]. Rizik od kardiovaskularnog mortaliteta je 8 puta veći kod pacijenta u 5. stadijumu HBI (JGF <15 ml / min / 1,73 m²) nego u odgovarajućoj populaciji bez bubrežne slabosti [23]. Iako aterosklerotska bolest napreduje sa progresijom HBI, kardiovaskularni događaji kod ovih bolesnika su uglavnom vezani za neaterosklerotsku etiopatogenezu, poput hipertrofije leve komore sa dijastolnom i sistolnom disfunkcijom, hipervolemijom i arterijskim kalcifikacijama. Ovi događaji se mogu manifestovati atrijalnim i ventrikularnim promenama, sve do srčanog zastoja i iznenadne srčane smrti [38]. Prihvaćeno je da je lečenje tradicionalnih faktora rizika za kardiovaskularne bolesti, poput hiperholesterolemije i hipertenzije, efikasno kod bolesnika sa HBI, posebno u početnim stadijumima. Postoje i dodatni faktori rizika koje bi trebalo uzeti u obzir, od kojih se većina smatra komplikacijama HBI [39, 40]. Primer netradicionalnih faktora rizika su mineralni i endokrini poremećaji, poput zadržavanja fosfata, povišenog nivoa fibroblastnog faktora rasta 23 i poremećaja metabolizma *Klotho* protein [41]. Bolje poznavanje faktora rizika koji doprinose razvoju KVB kod bolesnika sa HBI, i identifikacija dodatnih terapijskih ciljeva, zajedno sa naporima za kontrolu krvnog pritiska, adekvatnom ishranom i načinom života moglo bi doprineti globalnom smanjenju kardiovaskularnog opterećenja kod ovih bolesnika [42].

2.3. MINERALNO - KOŠTANI METABOLIZAM

Normalna ravnoteža mineralno-koštanog metabolizma, pre svega homeostaza kalcijuma i fosfora je od vitalnog značaja za organizam. Kalcijum i fosfor su esencijalni za brojne biološke sisteme, uključujući formiranje kostiju, energetski metabolizam, različite metaboličke puteve, kao i intracelularnu signalizaciju. Shodno tome, njihova endokrina regulacija je strogo kontrolisan proces. U fiziološkim uslovima postoji stalna interakcija između creva, kostiju, paratiroidnih žlezdi i bubrega [43].

Kalcijum (Ca) je peti najzastupljeniji element u ljudskom telu, koji ima strukturnu i neuromuskularnu ulogu, ulogu koenzima i intracelularnog sekundarnog galsnika. Dostupan je samo putem hrane, dnevne potrebe zavise od pola i starost. Kod dece postoji pozitivan bilans kalcijuma, dok kod starijih obično dolazi do smanjenja koštane mase, te je ovaj bilans negativan. Glavni regulatori homeostaze kalcijuma su paratiroidni hormon, koji deluje preko receptora za paratiroidni hormon (PTH1R) i 1,25 dihidroksivitamin D (kalcitriol) koji deluje na nuklearni vitamin D receptor (VDR).

Smanjenje Ca u cirkulaciji brzo inaktivise Ca-senzitivne receptore u paratiroidnim žlezdama (CaSR), što dovodi do povećanog lučenja PTH iz glavnih ćelija paratiroidnih žlezda [44]. PTH je polipeptid sastavljen od 84 aminokiselina, koji deluje na nivou distalnih tubula bubrega povećavajući reapsorpciju kalcijuma, kao i povećanom resorpcijom na nivou kostiju. Ako niski nivoi kalcijuma traju duže vreme, postoji povećana transkripcija PTH mRNA, što na kraju dovodi do povećane proliferacije paratiroidnih ćelija. Nasuprot tome, visok nivo kalcijuma u serumu aktivira CaSR i dovodi do brzog smanjenja lučenja PTH, što posledično dovodi do povećanog gubitka kalcijuma bubrezima, smanjene resorpcije iz kostiju i smanjene apsorpcije kalcijuma u crevima. Relativno male promene koncentracije kalcijuma izazivaju velike promene u lučenju PTH [45].

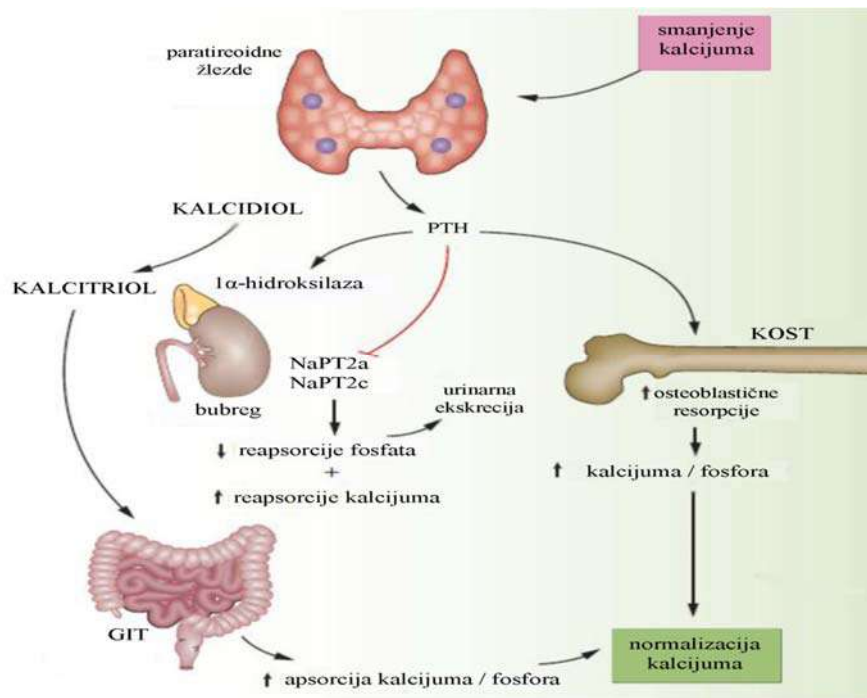
Vitamin D se može uneti hranom ili sintetisati u koži. Biološki aktivni oblik vitamina D nastaje preko 25-hidroksivitamina D u jetri, a zatim dejstvom 1-alfa-hidroksilaze u bubrezima do 1,25-dihidroksivitamina D, odnosno kalcitriola. U složenom sistemu povratnih sprega sinteza

kalcitriola je indukovana PTH-om, hipokalcemijom i hipofosfatemijom, a smanjena hiperkalcemijom i hiperfosfatemijom. VDR aktivacija u paratiroidnim žlezdama smanjuje sintezu i sekreciju PTH. U distalnim tubulima kalcitriol olakšava unos kalcijuma povećavajući broj katijonski kanala TRPV5 (od engl. *transient receptor potential vallinoid-5 channel*) na apikalnoj membrane, čineći ćelije tubula osjetljivijim na reapsorpciju kalcijuma posredovanu PTH-om [46]. Aktivacija VDR takođe olakšava apsorpciju kalcijuma u tankom crevu i povećava oslobađanje kalcijuma iz kostiju aktivacijom osteoklasta, a u uslovima velike potrebe za kalcijumom i iz osteocita.

Fosfor (P) je šesti najčešći element kod ljudi koji praktično nikada nije u svom elementarnom obliku već je pretežno vezan za kiseonik kao fosfat. Fosfat igra ključnu ulogu u energetskom metabolizmu preko adenzin trifosfata (ATP), u biološki važnim molekulima, kao što su DNK i RNK, i ulazi u sastav ćelijskih membrana, kao sastavni deo fosfolipida. Većina fosfata (približno 80%) je vezana za mineralizovano tkivo u obliku hidroksiapatita. Ostatak se distribuira u skeletnim mišićima i u ekstracelularnom prostoru. Homeostaza fosfata je slična kalcijumu, a održava je nekoliko faktora koji utiču na intestinalnu apsorpciju, bubrežnu reapsorpciju i skeletni metabolizam. Fiziološki raspon za serumski fosfat je širi nego za kalcijum, promene se bolje podnose, a adaptivni mehanizmi su mnogo brži.

Apsorpcija fosfata se odvija u tankom crevu, pasivnom difuzijom i aktivnim transportom pomoću natrijum zavisnog transportera fosfata - NaPT2b (od engl. *Sodium-Dependent Phosphate Cotransporters type 2b*). Visok unos fosfata ishranom povećava pasivni paracelularni unos, dok je aktivni transport indukovano kalcitriolom, povećavajući broj natrijum zavisnih transportera NaPT2b na luminalnoj strani enterocita [47]. Bubrezi su ključni organi u regulaciji fosfata. Fosfat se slobodno filtrira u glomerulu i reapsorbuje u proksimalnim tubulima. U fiziološkim uslovima, oko 70% filtriranog fosfata se ponovo apsorbuje. Reapsorpcija se može povećati u uslovima niskog sadržaja fosfata i određena je uglavnom povećanjem transportera NaPT2a i NaPT2c na apikalnoj strani ćelija proksimalnih tubula [48]. Osim creva i bubrega, kost igra važnu ulogu u metabolizmu fosfata. Fosfat je ključna komponenta u procesu mineralizacije matriksa od strane osteoblasta i osteocita. Nasuprot tome, kao glavno skladište fosfata skelet se

može prilagoditi promenama u zahtevima za ekstracelularnim fosfatom kroz promene u remodelovanju kostiju.



Slika 2 | Regulacija metabolizma kalcijuma i fosfata pomoću vitamina D i PTH
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [49])

Do nedavno se PTH smatrao glavnim hormonom odgovornim za održavanje homeostaze fosfata. Visok nivo fosfata u serumu nezavisno povećava lučenje PTH [50]. Zauzvrat, PTH smanjuje NaPT2a i NaPT2c na apikalnoj strani ćelija proksimalnog tubula, povećavajući tako gubitak fosfata urinom [50]. S druge strane, PTH signalizacija dovodi do povećanog odliva fosfata iz kostiju pojačanom resorpcijom. Dodatno, PTH indirektno povećava apsorpciju fosfata u tankom crevu aktivacijom 1-alfahidroksilaze u bubrezima. Uprkos tome što na nivou kostiju i creva utiče na povećanje fosfata, ukupni efekat PTH je smanjenje serumskog fosfata, pa ga stoga treba smatrati hormonom za snižavanje fosfata. Iako se razmatralo o postojanju receptora za osetljivost na fosfate, mehanizam pomoću kojeg se hormoni za regulaciju fosfata prilagođavaju promenama u serumskim fosfatima ostaje nejasan [51]. Poslednjih godina, identifikacija nove endokrine osovine koja sadrži fibroblastni faktor rasta 23 i *Klotho* protein dovela je do promene paradigme u razumevanju regulacije fosfata i mineralno-koštanog metabolizma uopšte.

Smanjenje funkcije bubrega, kod bolesnika sa HBI, u mnogome modifikuje čvrsto povezane mehanizme koji kontrolišu ove procese. Promene u faktorima koji regulišu homeostazu mineralno-koštanog metabolizma, naročito FGF23, javljaju se relativno rano u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji, i napreduju sa progresijom bubrežne slabosti [52, 53]. Vremenom ove promene mogu dovesti do hiperfosfatemije, nedostatka vitamina D, sekundarnog hiperparatiroidizmom i na kraju do brojnih abnormalnosti na kostima uz vaskularne kalcifikacije i kalcifikacije mekih tkiva.

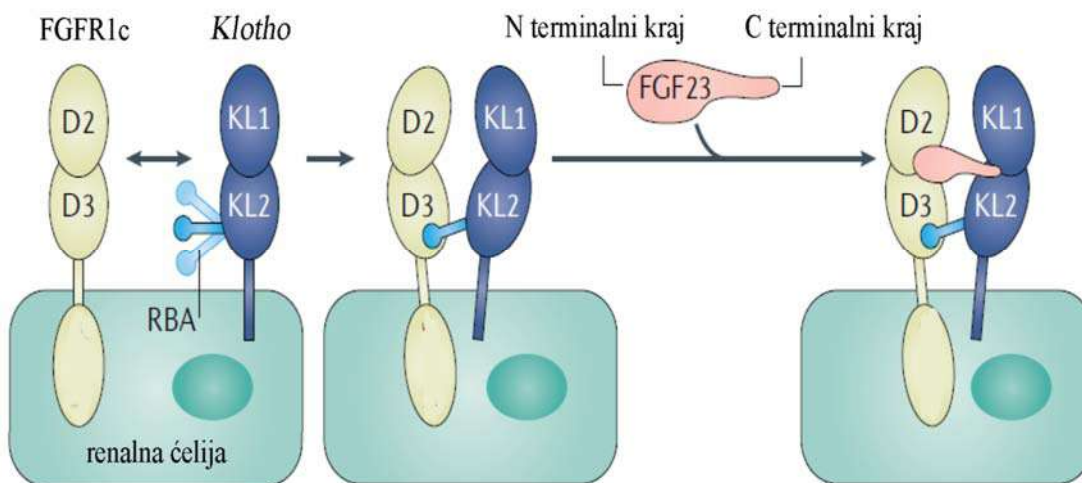
Kako bi se istakao značaj poremećaja mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom, predložen je novi termin, sindrom CKD-MBD (od engl. *chronic kidney disease - mineral and bone disorder*) [54]. Međutim, biološki efekti vitamina D, FGF23 i *Klotho* proteina su širi od njihove uloge u regulaciji metabolizma minerala. Oni predstavljaju značajne komponente u etiopatogenezi kardiovaskularnih komplikacija kod bolesnika sa HBI, čineći ciljna mesta za nove terapijske modele.

2.3.1. ULOGA FGF23 / *KLOTHO* U REGULACIJI METABOLIZMA KACIJUMA I FOSFATA

Fibroblastni faktor rasta 23 je hormon koji potiče iz kostiju, luče ga osteoblasti i osteociti. FGF23 pripada superfamiliji peptida koji ima plejotropne efekte na širok spektar bioloških funkcija [55]. Porodica FGF-ova sastoji se od dvadeset i dva člana koja su identifikovana kod ljudi, od kojih većina deluju kao parakrini / autokrini faktori [56]. Suprotno tome, FGF23, zajedno sa FGF19 i FGF21, ima endokrinu aktivnost [41]. Razlika u načinu delovanja između parakrinih i endokrinih FGF-a uglavnom se odnosi na njihov afinitet za heparin [57-59]. Parakrini FGF-ovi sadrže heparin vezujuće domene koji im omogućavaju vezivanje s visokim afinitetom za heparin sulfat u vanćelijskom matriksu, koji te faktore rasta povezuje sa ćelijama koje ih sintetišu i podstičući na taj način parakrino delovanje. Heparan sulfat je potreban da bi se parakrini FGF-ovi vezali i aktivirali svoje receptore - FGFR. Na primer, heparan sulfat se direktno vezuje za FGF2 i FGFR1 da bi formirao tročlani kompleks heparan sulfat - FGF2 - FGFR1, koji je potreban za aktiviranje tirozin kinaze, koji je intracelularni deo FGFR1.

Za razliku od parakrinih FGF-ova, endokrini FGF nemaju heparin vezujuće domene, što im omogućava difuziju dalje od mesta sinteze, odnosno ulazak u sistemska cirkulaciju [60]. Međutim, endokrinom FGF-u je i dalje potreban koreceptor kako bi se vezali za receptore u ciljnim organima. Umesto heparan sulfata, *Klotho* proteini funkcionišu kao koreceptor [61-63]. Za razliku od heparan sulfata, *Klotho* protein nije eksprimiran u svima tkivima, pa njegov obrazac ekspresije u kombinaciji sa FGFR određuje na koje organe će endokrini FGF-ovi ostvarivati svoje efekte. Zanimljivo je da je za razliku od mnogih receptorskih kompleksa za čije povezivanje su potrebni ligandi, formiranje *Klotho*-FGFR kompleksa je nezavisno od prisustva FGF liganda [61].

Studije koje su proučavale strukturu receptorskog kompleksa *Klotho* - FGFR1c pokazale su da se sa molekula *Klotho* proteina pruža dugačka nit – RBA (od engl. *receptor-binding arm*) koja je u direktnoj komunikaciji sa FGFR1c [64]. FGF23 se uklapa u tako formiran žleb, pri čemu je FGF23 N terminalni kraj orijentisan ka FGFR1c, dok je C kraj orijentisan ka *Klotho* proteinu (Slika 3).



Slika 3 | Formiranje kompleksa FGF23 – *Klotho* – FGFR1c
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [65])

Ovi nalazi potvrđuju da dve komponente receptorskog kompleksa deluju uzajamno i time razjašnjavaju funkciju *Klotho* proteina kao obaveznog koreceptora za FGF23. Zanimljivo je da trostruki kompleks FGF23, *Klotho* i FGFR1c ipak zahteva heparan sulfat da bi aktivirao tirozin kinazu FGFR1c. Iako je njegov afinitet za FGF23 jako nizak, heparan sulfat deluje u interakciji i

sa FGFR1c i FGF23. Postoji mogućnost da *Klotho*, pored RBA, ima i druga mesta za vezivanje i interakciju sa FGFR-a, što može objasniti višestruke funkcije rastvorljivog *Klotho*-a koje su nezavisne od FGF23 [66]. Obzirom na ulogu endokrinih FGF-ova u nizu fizioloških reakcija, uključujući mineralni i energetske metabolizam, stresne reakcije i poremećaje povezane sa starenjem, agonisti i antagonisti ovih hormona su potencijalne terapijske mete za različite poremećaje [67-69]. Očekuje se da će podaci dobijeni za endokrine FGF-ove i *Klotho* protein ubrzati razvoj novih lekova.

Ubrzo nakon otkrića *Klotho* proteina, identifikovana su još dva proteina i nazvani β *Klotho* i γ *Klotho* [70]. β *Klotho* formira binarne komplekse sa FGFR1c (u adipocitima) i FGFR4 (u hepatocitima), koji funkcionišu kao fiziološki receptori za FGF21 i FGF19 [62, 71]. Slično kao i insulin, FGF19 indukuje metaboličke reakcije nakon hranjenje, dok je FGF21 sličan glukagonu i reguliše metabolizam tokom gladovanja [41]. γ *Klotho* se može naći uglavnom u masnom tkivu, očima i bubregu [41, 72, 73].

2.3.2. STRUKTURA *KLOTHO* PROTEINA

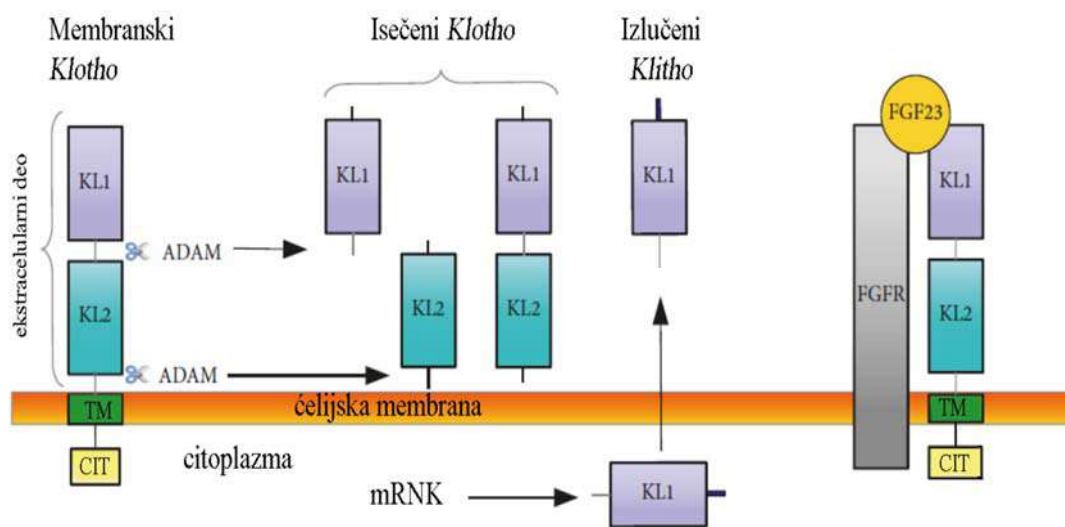
Klotho protein pripada grupi glikoproteina tip 1. Kod ljudi se sastoji od 1012 aminokiselina, eksprimira se na ćelijskim membranama, i naziva se membranski *Klotho* protein (protein vezan za ćelijsku membranu) [73-75]. Molekularna težina *Klotho* proteina je 135 kDa [76-79]. Membranski *Klotho* protein sastoji se iz tri domena: citoplazmatski (CIT), transmembranski (TM) i ektodomen (Slika 4). Ektodomen ima dva ponavljanja, KL1 i KL2, sa oko 450 aminokiselina [63, 73, 80].

Glavni tip *Klotho* proteina označen je kao α *Klotho*. Postoje dva tipa rastvorljivih (solubilnih) *Klotho* proteina: odcepljen (isečeni) i izlučen.

- Odcepljeni (isečeni) *Klotho* nastaju kao posledica delovanja membranskih proteaza ADAM 10 i ADAM 17 (od engl. *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing proteins*). Proteaze odvajaju / seku fragmente iz vanćelijskog domena u krv, urin i cerebrospinalnu tečnost [41, 73, 80]. ADAM 10 i 17 seku na dva načina, te nastaju tri

oblika. Prvi „rez” se javlja odmah iza transmembranskog domena i proizvod sadrži KL1 i KL2 fragmente (130 kDa). Drugi „rez” je lokalizovan između sekvenci KL1 i KL2 i oslobađa protein koji sadrži samo KL1 domen (68 kDa). Kada se pojavi dejstvo proteaza na oba mesta istovremeno domeni KL1 i KL2 se oslobađaju odvojeno [76, 80, 81].

- Pored toga, alternativni prekid transkripcije *Klotho* gena dovodi do stvaranja izlučenog Klotho (otprilike 65 kDa) [82]. Ovaj oblik *Klotho* proteina sadrži 549 aminokiselinskih ostataka, odgovara fragmentu KL1 i ima dodatnu C-terminalnu sekvencu. Nalazi se u krvi, urinu i cerebrospinalnoj tečnosti i njegov nivo opada s godinama [73, 74, 80].



Slika 4 | Membranski i rastvorljivih (odcepljeni i izlučeni) *Klotho* i FGF23 vezan za kompleks membranski *Klotho* i FGFR
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [83])

2.3.3. BILOŠKA ULOGA *KLOTHO* PROTEINA

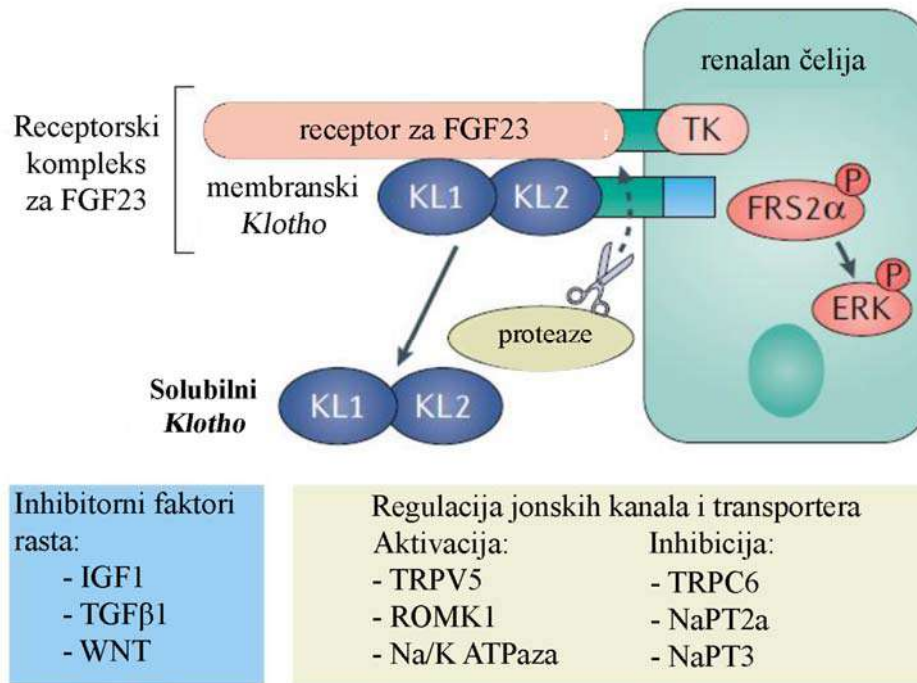
Glavna funkcija membranskog *Klotho* proteina je formiranje specifičnog receptora za vezivanje FGF23. Fibroblastni faktor rasta 23 može direktno da se veže za svoj receptor – FGFR. Međutim, *Klotho* kao koreceptor, formira kompleks *Klotho* – FGFR, čime se višestruko povećava afinitet za vezivanje FGF23 i njegovo delovanje [41, 73]. FGF23 inhibira natrijum zavisne transportere fosfata NaPT2a i reguliše reapsorpciju fosfata u proksimalnim tubulima bubrega [41, 73, 84]. Dakle, dolazi do negativnog balansa fosfata i kalcijuma promovišući

njihovu urinarnu ekskreciju i inhibiciju njihove apsorpcije u crevima [41, 73, 84, 85]. Treba napomenuti da paratireoidna žlezda pokazuje visoku *Klotho* ekspresiju i drugi su ciljni organ za FGF23. Studije pokazuju da FGF23 smanjuje lučenje paratireoidnoga hormona [86]. Membranski *Klotho* protein se ponaša kao obavezni koreceptor za FGF23 u regulisanju mineralnog metabolizma [73, 87].

Treba istaći da rastvorljivi oblik *Klotho* proteina može učestvovati u održavanju jonske homeostaze nezavisno od FGF23. *Klotho* pokazuje aktivnost β -glukuronidaze i sialidaze i modifikuje funkciju transportera u bubrezima i crevima [73, 88, 89]. Reapsorpcija bubrežnog kalcijuma i sekrecija kalijuma su regulisani TRPV5 (od engl. *transient receptor potential vallinoid-5 channel*) i ROMK1 kanalima (od engl. *renal outer medullary potassium channel 1*). TRPV5 se nalaze pretežno u distalnim tubulima, dok je ROMK1 ekspresija dokazana u distalnim tubulima i sabirnim kanalićima [90-93]. Eksperimentalni podaci su pokazali defekt u izlučivanju jona K i hiperkalemiji kod ROMK1^{-/-} miševa čija je ishrana bila bogata kalijumom [92]. Intravenozno primena rastvorljivog *Klotho* proteina kod pacova povećala je urinarnu ekskreciju kalijuma. Administracija *Klotho* ne menja nivo K u plazmi [93]. Međutim, povezanost između nivoa *Klotho*, ROMK1 i plazmatskog K treba dalje istražiti.

I rastvorljivi *Klotho* može delovati kao fosfaturični faktor i inhibirati NaPT2a transportere fosfata u proksimalnim tubulima bubrega. Kroz svoju aktivnost β -glukuronidaze, *Klotho* modifikuje NaPT2a i dovodi do njihove internalizacije na apikalnoj strani membrane što vodi do smanjenja apsorpciju fosfata, takođe nezavisno od FGF23 [73, 94].

Pokazano je da rastvorljivi ili solubilni oblik *Klotho* proteina ima aktivnost endokrinog, autokrinog i parakrinog hormona. *Klotho* je uključen u regulaciju oksidativnog stresa, inflamacije i fibroze inhibicijom insulina, odnosno insulinu sličnog faktora rasta-1 (IGF-1) i transformišućeg faktora rasta β 1 (TGF- β 1) [73, 79, 95-98].



Slika 5 | Regulatorne funkcije solubilnih *Klotho* proteina
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [65])

Dobro je dokumentovano da je FoxOs (od engl. *forkhead box protein O*) transkripcioni faktor koji inhibira PI3K/Akt signalni put (fosfatidilinozitol 3-kinaza / serin-treonin kinaza signalni put). FoxOs kontroliše gene koji su uključeni u ćelijsku diferencijaciju, rast, ćelijski ciklus, metabolizam lipida i glukoze i uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) [95, 99]. Suzbijanje signalnog puta insulina / IGF-1 / PI3K dovodi do aktiviranja FoxOs i pojačane ekspresije mangan superoksid dismutaze (MnSOD), superoksidnog neutralizatora. Posledično, *Klotho* inhibicija insulina / IGF1/ PI3K signalizacija dovodi do povećane otpornosti na oksidativni stres i povoljno utiče na starenja (*antiaging* mehanizme) [95, 96, 99]. U novije vreme, Takenaka i saradnici (2017) su pokazali da nakon suplementacije egzogenog *Klotho* proteina kod miševa dolazi do smanjenja krvnog pritiska, albuminurije i oksidativnog stresa kod dijabetesa [98, 100].

Postoje podaci da je *Klotho* ekspresija smanjena u uslovima dugotrajnog stresa [98, 101]. Smanjenje *Klotho* ekspresije otkriveno je u istraživanju mIMCD3 kulturi mišjih ćelija (od engl. *innermedulla collecting duct3*), tretiranih vodonik peroksidom (H₂O₂) i na taj način izložene

oksidativnom stresu. Rezultati su pokazali da primenom egzogenog *Klotho* proteina dolazi do značajnog smanjenja apoptoze izazvane H₂O₂, što ukazuje da *Klotho* može imati zaštitni efekat na ćelije prevencijom apoptoze prouzrokovane oksidativnim stresom [101].

Slično je pokazano i u animalnom modelu gde su izazvane ishemijsko-reperfuzione (I / R) povrede bubrega pacova. Ishemijska akutna bubrežna insuficijencija pogoršana je smanjivanjem bubrežnog *Klotho*, dok je indukcija ekspresije *Klotho* gena imala zaštitni efekat od I / R povrede [102]. Slično tome, Oh i saradnici su pokazali da je kod bolesnika u ESRD *Klotho* deficit povezan sa pojačanim oksidativnim stresom i inflamacijom [103]. Stoga, uzimajući u obzir činjenicu da je razvoj kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa ESRD čest, *Klotho* protein bi mogao da obezbedi zaštitu kardiovaskularnog sistema [103].

2.3.4. FGF23 - *KLOTHO* ENDOKRINA OSOVINA

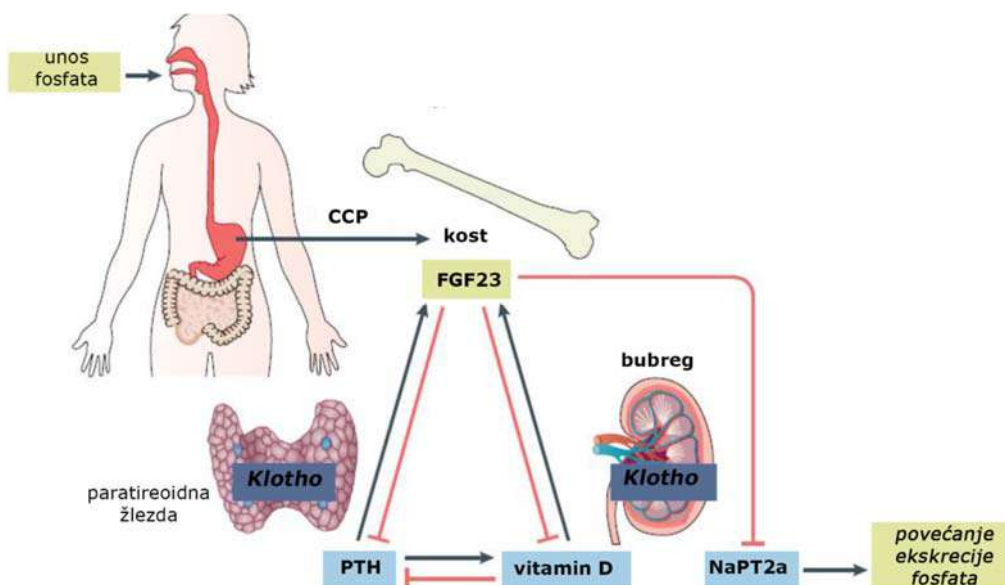
FGF23 se vezuje za kompleks α *Klotho*-FGFR i posreduje u regulaciji fizioloških procesa bitnih za održavanje homeostaze fosfata i kalcijuma, pre svega na nivou bubrega i paratireoidnih žlezdi. Shodno tome, poremećaj endokrine osovine FGF23 - *Klotho* ima presudnu ulogu u patofiziologiji bubrežnih i koštanih oboljenja.

FGF23 izlučuju osteociti kao odgovor na unos fosfata [104, 105]. Glavni ciljni organ za FGF23 su bubrezi, u kojima je dokazana visoka ekspresija *Klotho* [106, 107]. Vezivanje FGF23 na kompleks *Klotho* i FGFR1c (ili FGFR3c ili FGFR4) dovodi do povećanog izlučivanja fosfata urina u roku od nekoliko sati [10]. Miševi kojima nedostaje FGF23 ili *Klotho* imaju hiperfosfatemiju, što sugerise da je FGF23 - *Klotho* endokrina osovina neophodna za održavanje homeostaze fosfata [108].

U bubrezima, FGF23 indukuje internalizaciju i razgradnju natrijum zavisnog transportera fosfata 2A (NaPT2a) i smanjuje njegovu ekspresiju. NaPT2a su lokalizovani na apikalnoj strani ćelijske membrane proksimalnih tubula, glavnog mesta reapsorpcije fosfata [109]. Gubitak NaPT2a rezultira smanjenom reapsorpcijom fosfata u proksimalnim tubulima bubrega i povećanim

izlučivanjem fosfata mokraćom [110, 111]. FGF23-indukovana fosfaturija klinički se procenjuje merenjem frakcione ekskrecije fosfata (FEP) [112].

FGF23 snižava nivo aktivnog vitamina D i PTH u serumu [110, 113, 114]. U proksimalnim tubulima bubrega, FGF23 suzbija ekspresiju *Cip27b1*, koja kodira 1 α -hidroksilazu, enzima koji pretvara 25-dihidroksivitamin D3 u aktivni vitamin D (1,25-dihidroksivitamin D3). Pored toga, FGF23 povećava ekspresiju *Cip24a1*, koja kodira 24-hidroksilazu, enzima koji pretvara 25-dihidroksivitamin D3 u neaktivan vitamin D (24,25-dihidroksivitamin D3). Pretpostavlja se da efekat FGF23 na ekspresiju *Cip24a1* možda nije direktan [115]. Sprečavanjem sinteze aktivnog vitamina D i podstičući stvaranje neaktivnog vitamina D, FGF23 snižava nivo aktivnog vitamina D u serumu.



Slika 6 | FGF23 – *Klotho* endokrinska osovina
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [65])

Paratireoidna žlezda je jedno od retkih tkiva gde je prisutna *Klotho* ekspresija, što sugerise da je ciljani organ za FGF23. FGF23 suzbija ekspresiju i izlučivanje PTH kada se aplikuje *in vitro* ćelijama paratireoidnih žlezdi ili aplikuje pacovima [113]. Međutim, eksperimentalni modeli kod kojih je izazvano “brisanje” *Klotho* proteina u paratireoidnim žlezdama, pokazuju da FGF23 ima sposobnost da suzbija PTH, što sugerise da lokalna ekspresija membranskog *Klotho* nije neophodna za ovaj efekat. U stvari, pored pokretanja FGF signalizacije na *Klotho* zavisani način, FGF23 takođe može aktivirati signalni put zavisno od kalcineurina u odsustvu *Klotho* protein, za

suzbijanje PTH [116]. Dakle, ova tri ključna hormona koji regulišu metabolizam minerala FGF23, vitamin D i PTH - međusobno su povezani putem negativnih povratnih sprega koje deluju na održavanje homeostaze fosfata (Slika 6).

Sumirano, kao odgovor na unos neorganskog fosfata, osteociti izlučuju FGF23. Mehanizmi pomoću kojih osteociti detektuju fosfor nije potpuno jasan, ali može uključivati senzitivnost na čestice kalciproteina u serumu (CPP) (nanočestice koje sadrže kalcijum i fosfat u čvrstoj fazi i serumski protein fetuin A). Povećani nivo FGF23 dovodi do povećanja urinarne ekskrecije fosfata, smanjivanjem natrijum zavisinih transportera fosfata, tip 2a (NaPT2a) u proksimalnim tubulama i smanjujući ulazak kalcijuma u cirkulaciju snižavanjem nivoa paratireoidnog hormona i aktivnog vitamin D u serumu. Povećavanjem urinarne ekskrecije fosfata i suzbijanje ulaska kalcijuma u krv, kao odgovor na unos fosfata, omogućava FGF23-Kloto endokrinom osovini održavanje homeostazu fosfata i potencijalno sprečavanje stvaranje viška CPP.

2.3.5. REGULACIJA EKSPRESIJE FGF23 I KLOTHO

Mehanizam pomoću kojeg osteociti sintetišu FGF23 kao odgovor na fosfat nije poznat. Jedna mogućnost je da u osteocitima postoji ekspresija fosfor senzitivnog receptora koji, kada se aktivira, indukuje sekreciju FGF23, analogno postojanju ekspresije receptora osetljivih na kalcijum u paratiroidnim ćelijama [117]. Međutim, nivoi FGF23 u serumu koreliraju ne samo sa nivoom fosfata u serumu već i sa nivoom kalcijuma u serumu. Preciznije rečeno, u uslovima hipokalcemije, porast nivoa fosfata u serumu ne dovodi do povećanja nivoa FGF23. Slično tome, nivoi FGF23 se ne povećavaju kao odgovor na povećanje nivoa kalcijuma u serumu u uslovima hipofosfatemije, što ukazuje da su i kalcijum i fosfat potrebni za podsticanje sinteze FGF23 u osteocitima [118, 119].

Pored fosfata, kalcijuma, PTH i aktivnog vitamina D, ekspresija FGF23 se takođe povećava pod uticajem aldosterona [120]. Lečenje miševa aldosteronom rezultira povećanjem nivoa FGF23 u serumu i kostima. Treba napomenuti da se tretiranjem osteoblastnih ćelija *in vitro* aldosteronom povećava ekspresiju FGF23 na NF- κ B (nuklearni faktor κ B) zavisani način. S obzirom da

promotorski region FGF23 sadrži element koji reaguje na NF- κ B, aktiviranje NF- κ B izazvano aldosteronom može biti odgovorno za porast ekspresije FGF23 kao odgovor na aldosteron [121].

Slično tome, proinflamatorni citokini, kao što su IL-1, IL-6, i faktor nekroze tumora, mogu izazvati ekspresiju FGF23 putem aktivacije NF- κ B signalnog puta zapaljenja [122]. Proinflamatorni citokini takođe indukuju sekreciju hepcidina u jetri. Heparin je hormon koji snižava vrednost cirkulišućeg gvožđa, te izaziva funkcionalni nedostatak gvožđa kada je njegova koncentracija izrazito visoka. Za razliku od aldosterona, gvožđe je negativan regulator nivoa FGF23, a nedostatak gvožđa povećava proizvodnju FGF23 nezavisno od upale, verovatno povećanjem ekspresije i stabilnosti hipoksijom indukovano faktora 1a (HIF1a), koji se veže za elemente koji reaguju na hipoksiju u promotorskom region FGF23 i indukuje njegovu transkripciju [123].

Nekoliko faktora koji regulišu ekspresiju FGF23 takođe može kontrolisati ekspresiju *Klotho*. Aktivni vitamin D može direktno indukovati ekspresiju *Klotho*, pošto promotor *Klotho*, slično kao i FGF23, sadrži više elemenata koji reaguju na vitamin D [124, 125]. Za razliku od dejstva na FGF23, aldosteron smanjuje bubrežni nivo *Klotho* protein [126]. Vazokonstriktorni angiotenzin II ima isti supresivni efekat. Suprotno tome, primena blokatora receptora angiotenzina II (AT1) i inhibitora angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE) povećava bubrežni nivo *Klotho* proteina kod pacova, nezavisno od sposobnosti ovih blokatora renin-angiotenzin-aldosteronskog sistema (RAAS) za snižavanje krvnog pritiska ili za smanjenje proteinurije. Ova zapažanja sugerišu da je RAAS negativni regulator *Klotho* proteina u bubrežima [127].

Pored RAAS-a, FGF23 je moćan negativni regulator *Klotho* ekspresije. Zapravo, *Klotho* je najznačajnije smanjen transkript u analizi ekspresije gena u bubrežima iz transgenih miševa koji su prekomerno eksprimirali FGF23 [128]. Zbog toga, bilo koji faktor koji povećava ekspresiju FGF23, uključujući povećani unos fosfata, aktivaciju NF- κ B u upali i HIF1a aktivaciju, može indirektno smanjiti ekspresiju *Klotho in vivo*. Smanjena ekspresije *Klotho* pomoću FGF23 može biti deo regulatornog sistema pri čemu nishodna regulaciji liganda indukuje smanjenje ekspresije njegovog receptora.

2.4 FOSFAT I STARENJE

Miševi kojima nedostaje α *Klotho* ili FGF23 ne samo da imaju disbalans fosfata i hiperfosfatemiju usled poremećaja izlučivanja fosfata, već razvijaju složene fenotipove koji su karakteristični za prerano starenje, uključujući loš rast, atrofiju više organa (timus, koža), vaskularne kalcifikacije, sarkopeniju, srčanu hipertrofiju i fibrozu, osteopeniju, emfizem pluća, smetnje sluha, kognitivno oštećenje i skraćeni životni vek [63, 129-134]. Nakon što miševi počnu da dobijaju hranu sa manje fosfata većina ovih simptoma prevremenog starenja je ublažena, jer se uspostavlja ravnoteža fosfata [135]. Treba napomenuti da miševi kojima nedostaje *Klotho* ili FGF23 takođe imaju visoke nivoe aktivnog vitamina D u serumu, koji se dodatno povećavaju dijetom sa malo fosfata [84, 135-137].

Ovi rezultati ukazuju na to da je disbalans fosfata, prvenstveno odgovoran za razvoj simptoma sličnih starenju kod miševa koji nemaju funkcionalni FGF23 ili *Klotho*. Kod ljudi je primećeno zadržavanje fosfata povezano sa niskom ekspresijom *Klotho*, visokim nivoom FGF23 u serumu i simptomima prevremenog starenja kod bolesnika u krajnjem stadijumu bubrežne bolesti, a ograničenje fosfata može biti efikasna terapija za poboljšanje simptoma povezanih sa starenjem. Sličnost između miševa kojima nedostaje α *Klotho* i pacijenata sa HBI pokrenula je ideju da se HBI može posmatrati kao klinički model prevremenog starenja, i da bilo koji životinjski modeli koji su povezani sa HBI ili starenjem mogu pružiti uvid u nove strategije lečenja bolesnika sa HBI [138, 139].

2.4.1. ČESTICE KALCIPROTEINA KAO POSREDNICI OŠTEĆENJA IZAZVANOG FOSFATIMA

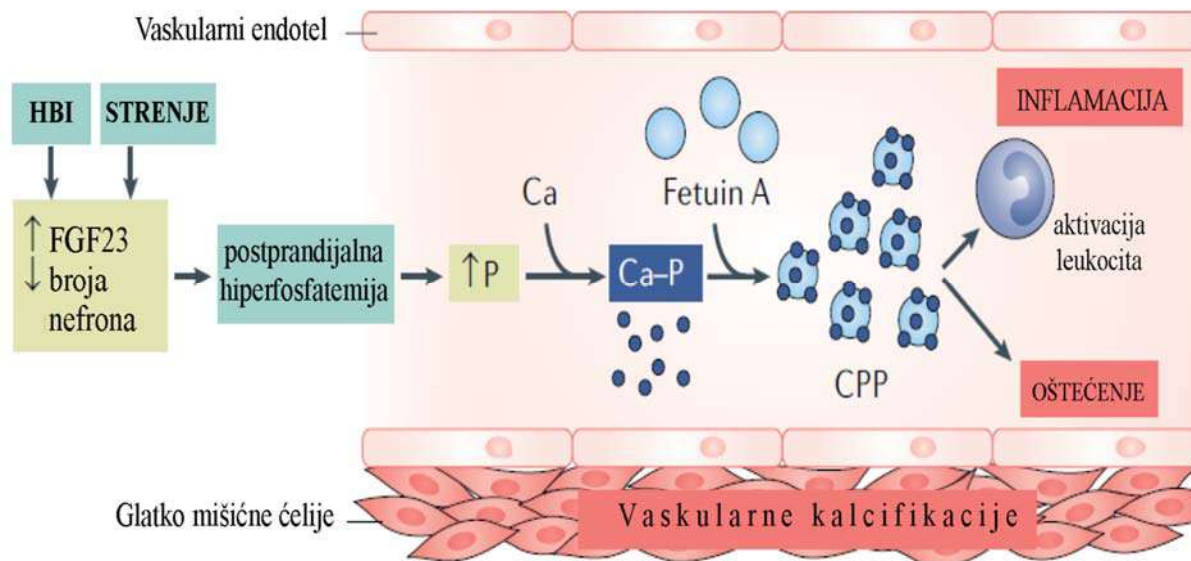
Čestice kalciproteina su nanočestice koje sadrže kalcijum fosfat u čvrstoj fazi i serumski protein fetuin A, a disperguju kao koloidi u cirkulaciji [140, 141]. Pošto je krv prezasićena u smislu jona kalcijuma i fosfata, čak i neznatno, prolazno povećanje koncentracije kalcijuma i / ili fosfata može pokrenuti precipitaciju kalcijum-fosfata. Prolazno povećanje nivoa fosfata u serumu, ali ne i kalcijuma, događa se nakon svakog obroka (postprandijalna hiperfosfatemija) što može izazvati taloženje kalcijum-fosfata [142]. Međutim, adsorpcija fetuina A, koji može da veže velike

količine precipitata kalcijum-fosfata (CaP), sprečava da precipitati kalcijum-fosfata prerastu u velike kristale [141]. Nivo CPP u krvi prolazno se povećava postprandijalno i smatra se da ove nanočestice deluju kao odbrambeni mehanizam koji sprečava rast kristala kalcijum-fosfata u vanćelijskom prostoru [143].

Međutim, CPP nije nužno bezopasan. Nanokristali kalcijum-fosfata i CPP mogu aktivirati makrofage i mogu delovati kao patogeni stimulansi koji pokreću imune odgovore [144]. Pored toga, povećanje koncentracije fosfata u medijumu ćelijske kulture indukuje apoptozu kultivisanih vaskularnih endotelnih ćelija i kalcifikaciju glatko mišićnih ćelija *in vitro* [145-148]. Zanimljivo je da se ova „toksičnost fosfata“ ne primećuje u prisustvu inhibitora koji sprečavaju taloženje kalcijum-fosfata, što sugeriše da fosfat sam po sebi nije patogen, već kalcijum-fosfat ili CPP [149].

Pored prisustva CPP u krvi, moguće je da se iste čestice formiraju i u bubrežnoj tubularnoj tečnosti, jer FGF23 suzbija reapsorpciju fosfata, ali ne i tečnost, što verovatno dovodi do povećanja koncentracije fosfata u tečnosti proksimalnih tubula. Studije na pacovima koji su dobijali hranu sa više fosfata, te nakon toga bili podvrgnuti subtotalnoj nefrektomiji pokazuju da su koncentracije fosfata značajno veće u tečnosti proksimalnih tubula nego u krvi. U tubularnoj tečnosti koncentracija fosfata prelazi nivo na kome se obično kalcijum-fosfat taloži. Kako nanokristali kalcijum-fosfata mogu prouzrokovati oštećenje bubrežnog epitela indukujući oksidativni stres, promene koje prate progresiju HBI bar delimično mogu biti posledica oštećenja uzrokovanog kalcijum-fosfatom ili CPP [150].

Još uvek nema egzaktnih dokaza koji potvrđuju da su precipitati kalcijum-fosfata prisutni u proksimalnom tubulu i da doprinose gubitku nefrona ili starenju bubrega. Međutim, koloidi disperguju nerastvorljive materije i koriste se za transport tih materijala između organa kroz krvotok. Ako se pogrešno talože na arterijama, uz imunološka oštećenja, precipitati kalcijum-fosfata mogu potencijalno izazvati arteriosklerozu (odnosno vaskularnu kalcifikaciju i smanjenje elastičnosti krvnih sudova) i hroničnu neinfektivnu inflamaciju.



Slika 7 | CPP-posredovana infalmacija i vaskularna oštećenja
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [151])

Kliničke studije su identifikovale nekoliko parametara koji su u korelaciji sa povećanim nivoom CPP u krvi, uključujući starost, povišen nivo serumskog fosfata i smanjenje jačine glomerulske filtracije [152-154]. Pored toga, nivoi CPP u serumu pozitivno koreliraju sa parametrima vaskularnih kalcifikacija, krutosti arterija i inflamacijom [153, 155, 156]. Treba napomenuti da dijeta bogata fosfatima indukuje endotelnu disfunkciju koja je povezana sa povećanjem nivoa fosfata u serumu [142]. Činjenica da nanokristali kalcijum-fosfata i CPP mogu izazvati oštećenje vaskularnih endotelnih ćelija, kalcifikaciju glatko mišićnih ćelija i imunološke reakcije *in vitro*, povećava mogućnost da nivoi CPP u plazmi i / ili u serumu mogu biti uzročno povezani sa arteriosklerozom i inflamacijom *in vivo*. Ono što je posebno važno, hronična neinfektivna inflamacija je mogući mehanizam koji stoji u procesu starenja, te na taj način, CPP može izazvati inflamaciju, što zapravo može biti veza između fosfata i simptoma povezanih sa starenjem, odnosno progresijom hronične bubrežne slabosti (Slika 7) [157, 158].

Nedavno su objavljeni interesantni podaci vezani za toksičnost fosfata. Sastav ljudskog tela podseća na morsku vodu. U stvari, devet od deset najzastupljenijih elemenata u ljudskom telu prisutno je u morskoj vodi, izuzetak je fosfor, što implicira da je ovaj element stečen u nekom trenutku tokom evolucije [159]. Ova promena dogodila se pre oko 400 miliona godina, kada se

tzv. koštana riba (*Osteichthyes*) razvijala, i krenulo nakupljnje fosfora u kostima u obliku kalcijum-fosfata [159, 160]. Do tada su životinjski skeleti bili sastavljeni od kalcijum karbonata ili hrskavice. Kostii kalcijum-fosfata, posebno hidroksiapatit, su čvršće i jače od hrskavice, i smatra se da su preduslov za evoluciju kopnenih kičmenjaka, jer je skelet morao da podrže telo na kopnu. Međutim, evolucija kostiju morala je biti praćena razvojem mehanizama za sprečavanje „toksičnosti fosfata“, koja je rezultat rasta kristala kalcijum-fosfata u ekstraskoletnim tkivima. Formiranje čestica kalciproteina može se posmatrati kao jedan od ovih mehanizama. *Klotho* gen postoji samo kod životinja čije su kosti sačinjene od kalcijum-fosfata, što sugeriše da je i endokrina osa *Klotho*-FGF23 evoluirala da spreči toksičnost fosfata održavanjem stroge homeostaze fosfata [160]. Očekuje se da će dalja istraživanja mialno-koštanog metabolizma identifikovati nove terapijske ciljeve za starenje ljudi i bolesti povezane sa starenjem, kao što je HBI.

Smanjenje broja nefrona (nastalo kao rezultat starenja ili HBI) uz odsustvo smanjenja unosa fosfata ishranom, indukuje povećanje FGF23 za održavanje homeostaze fosfata, povećanjem izlučivanja fosfata po nefronu. Oštećenje tubula i intersticijska fibroza nastaju kada izlučivanje fosfata po nefronu prelazi ~ 1,0 µg / dan, što dodatno smanjuje broj nefrona [161]. Ova spirala propadanja nefrona može se očekivati kada se broj nefrona smanji za ~ 50%. Pretpostavljajući da zdrave odrasle osobe izlučuju ~ 1 g / dan fosfata urinom i imaju ~ 1 milion nefrona po bubregu, smanjenje nefrona za oko 50% će se verovatno pojaviti kod pacijenata sa ranim stadijumom HBI, jer je smanjenje za 50% prisutno i kod starijih osoba kao posledica prirodnog starenja [162]. Iako unilateralna nefrektomija kod zdravih davalaca bubrega takođe rezultira smanjenjem broja nefrona za 50%, ovaj gubitak možda nije ekvivalentan gubitku nefrona od 50% koji nastaje starenjem ili zbog HBI. Nakon unilateralne nefrektomije kod zdravih davalaca bubrega, nivo FGF23 raste i JGF opada, ali obe varijable su delimično oporavljaju nakon određenog vremena [163, 164]. Suprotno ovome, poboljšanje JGF obično se ne očekuje kod starijih osoba ili pacijenata sa HBI, verovatno zato što, za razliku od donora bubrega, imaju ograničen kapacitet bubrežne rezerve ili imaju primarno oboljenje koje izaziva oštećenje bubrega. Stoga, porast nivoa FGF23 treba da bude upozorenje za višak fosfata u odnosu na preostali broj nefrona i trebalo bi da potakne razmatranje ograničenja fosfata u ishrani ili započinjanje lečenja vezačima fosfata kod normofosfatemičnih bolesnika sa HBI.

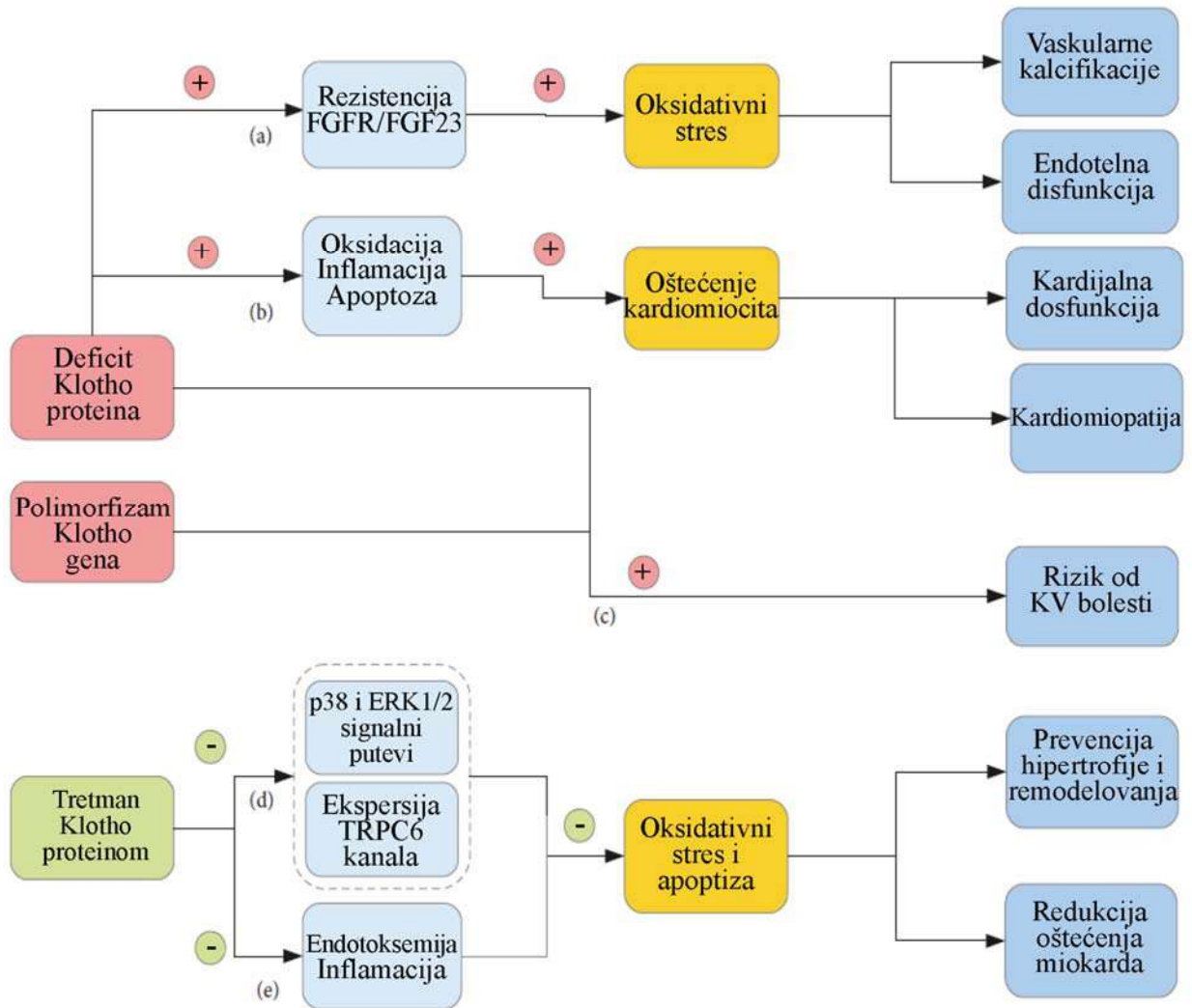
Terapija vežbanjem za sprečavanje gubitka koštane mase takođe se može smatrati oblikom „restrikcije fosfata“, jer može smanjiti količinu ekskretovanih fosfata, skladištenjem u kostima iz sistemske cirkulacije. Klinička studija iz 2018. godine pokazala je da je sedentarni način života (sedeći, naslonjeni ili ležeći položaji) duže od 6–8 h / dan povezano sa povećanim rizikom od smrtnosti, kako od opšteg tako i od kardiovaskularnog mortaliteta [165]. Međutim, ostaje da se utvrdi da li je sedentarni način života povezan sa visokim nivoom FGF23 u serumu i / ili gubitkom kostiju. Cilj tretmana obolelih od HBI je kombinovanje terapije lekovima, dijeta i moguće vežbanja radi postizanja restrikcije fosfata, ne u smislu ublažavanje vaskularnih kalcifikacija već smanjenje izlučivanja fosfata po nefronu, čime se sprečavaju oštećenja bubrežnih tubula i fibroza, te očuvanje preostalih nefrona. Ova nova paradigma restrikcije fosfata dovodi u pitanje postojeće pristupe koji imaju za cilj da smanje nivo serumskog fosfata u bolesnika sa hiperfosfatemijom kako bi se sprečila vaskularna kalcifikacija i eventualni kardiovaskularni događaji.

2.5. *KLOTHO* NEDOSTATAK I RIZIK ZA KARDIOVASKULARNE BOLESTI

Prvo istraživanje o nivou *Klotho* proteina i kardiovaskularnih bolesti (KVB) obavljeno je 2011. godine od strane *Semba* i saradnika [166]. Analizirani su faktori rizika za kardiovaskularne događaje kao što su: starost, pol, ukupni holesterol, HDL holesterol, sistolni krvni pritisak i dijabetes. Zanimljivo je da je rizik od KVB bio niži u ispitanika sa višim nivoom *Klotho* [166]. Slični rezultati su dobijeni u istraživanju povezanosti između plazmatskog *Klotho* i KVB kod zdravih volontera bez poznatih faktora rizika za kardiovaskularne događaje [167]. Istraživani su rani prediktori ateroskleroze, kao što su debljina intime-medije karotidne arterije, debljina epikardnog masnog tkiva i test dilatacije posredovane protokom (od engl. *Flow-mediated dilatation* - klinički test za procenu funkcije vaskularnog endotela na nivou brahijalnih arterija). Pokazano je da niži nivo *Klotho* proteina treba smatrati ranim prediktorom ateroskleroze [167].

Analizirajući do sada objavljene studije, koje se fokusiraju na ulogu *Klotho* proteina u razvoju kardiovaskularnih bolesti, pokušalo se šematski prikazati verovatni etiopatogenetski mehanizmi po kojem je *Klotho* protein uključen u patogenezu kardiovaskularne bolesti (Slika 8).

- a) Lokalni nedostatak *Klotho* vaskularnog porekla dovodi do kalcifikacije krvnih sudova. Povezan je sa rezistencijom FGFR / FGF23, što zauzvrat inhibira antikalifikacione efekte FGF23. Smanjena ekspresija *Klotho* proteina u zidu krvnog suda smanjuje proizvodnju NO i povećava stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (RVK). Stoga, neravnoteža *Klotho* i FGF23 dovodi do oksidativnog stresa i endotelne disfunkcije.
- b) Smanjenje *Klotho* proteina može promovisati prooksidativno, proinflamatorno, proapoptotsko delovanje i oštećenje kardiomiocita uz povećanje rizika za KVB. Kao posledica toga, mogu se primetiti srčana disfunkcija i kardiomiopatija.
- c) *Klotho* deficit i polimorfizmi *Klotho* gena su faktori rizika za kardiovaskularne bolesti i koreliraju sa razvojem ateroskleroze, bolesti koronarnih arterija, infarktom miokarda i hipertrofijom leve komore (HLK).



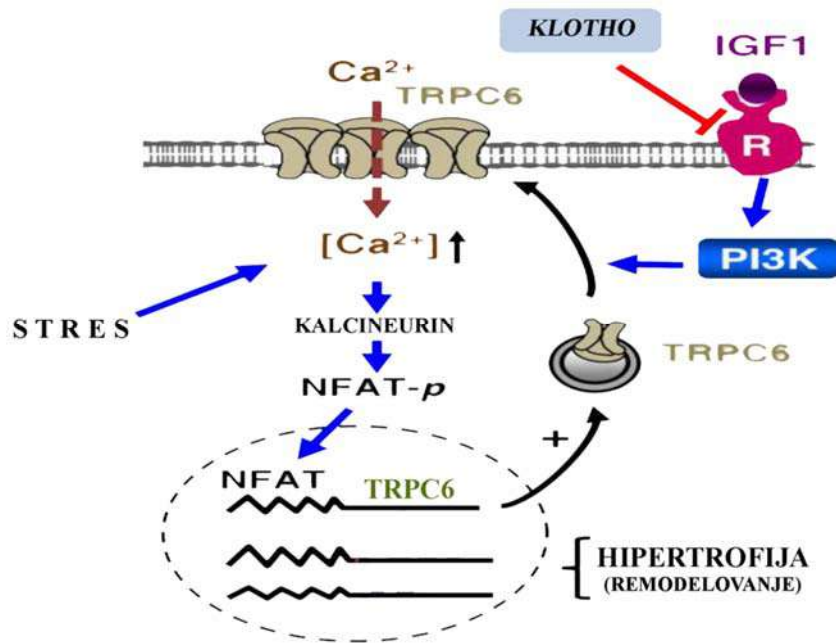
Slika 8 | *Klotho* protein i kardiovaskularne bolesti
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [83])

d) Pojava srčane hipertrofije i remodeliranje u stanju *Klotho* nedostatka povezana je sa oksidativnim stresom. To je uzrokovano aktiviranjem p38 i ERK1/2 signalnih puteva, kao i prekomernom ekspresijom TRPC6 kanala u srcu. Tretman egzogenim *Klotho* proteinom može pružiti zaštitu od fibroze.

e) *Klotho* doprinosi ublažavanju srčane disfunkcije i patoloških promena u toksičnim i ishemičnim promenama na srcu. Lečenje *Klotho*-om ublažava inflamaciju, smanjuje RVK, apoptozu, disfunkciju mitohondrija, fibrozu i hipertrofiju. *Klotho* može izazvati obnavljanje srčane funkcije i na taj način se može sagledavati kao potencijalni terapijski faktor promena na kardiovaskularnom sistemu.

2.6. KLOTHO PROTEIN I HIPERTROFIJA LEVE KOMORE

Srčana hipertrofija i remodelovanje se javljaju kao odgovor na razne patogene stimulse, kao što su hronično opterećenje pritiskom, hronično opterećenje volumenom ili infarkt miokarda, a u skorije vreme je pokazano da i oksidativni stres rezultira apoptozom kardiomiocita i stoga je uključen u remodelovanje leve komore [168, 169].



Slika 9 | Kardioprotektivni efekti *Klotho* proteina
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [170])

Proučavanjem životinjskih modela otkriveno je da miševi kojima nedostaje *Klotho* razvijaju izražene patološke promene, u vidu remodelovanje i hipertrofije srca i nakon prekomerne stimulacije izoproterenolom (ISO) [170]. Zabeležena je povećana ekspresija kalcijumskih katjonskih TRPC6 kanala (od engl. *transient receptor potential canonical 6*) na površni kardiomiocita [170-173]. U fiziološkim uslovima njihova aktivnost je mala, dok stresni faktori uzrokuju porast, uz poremećaj kalcijum zavisne signalizacije u kardiomiocitima. U uslovima stresa dolazi do prekomerne ekspresije TRPC6 gena, preko calcineurina i nuklearnog faktora aktivacije T ćelija, i povećane sinteze TRPC6 kanala, što pogoduje hipertrofiji. Fosfatidil – inozitol 3 kinaza, stimuliše egzocitozu TRPC6 kanala. Cirkulišući *Klotho* preko receptora za insulinu sličan faktor rasta blokira fosfatidil – inozitol 3 kinazu i smanjuje egzocitozu TRPC6 kanala, i na taj način smanjuje razvoj hipertrofije leve komore [170-172]. Pokazano je da su

promene miokarda, izazvane ISO, smanjene kod transgenih miševa koji prekomerno ekspimiraju *Klotho*. Ovi novi nalazi pružaju ubedljive dokaze da *Klotho* smanjuje TRPC6 kanale i tako sprečava patološke promene na srcu.

Klotho kardioprotektivni mehanizam se zasniva i na njegovom antioksidativnom delovanju. *Iang* i saradnici su testirali uticaj indoksil sulfata (IS) uremijskog toksina na hipertrofiju leve komore u korelaciji sa *Klotho* proteinom [174]. Poznato je da IS ima prooksidativni i prohipertrofični uticaj, a njegov serumski nivo je povišen kod bolesnika sa HBI [174, 175]. Otkriveno je da su snižen nivo *Klotho* protein i povišeni nivoi IS bili povezani sa povećanom masom leve komore kod bolesnika sa bubrežnom insuficijencijom [174]. Istraživači su kreirali animalni model hipertrofije leve komore kod hronične bubrežne insuficijencije kod miševa, a zatim ih tretirali egzogenim *Klotho* proteinom. Egzogeno primena *Klotho* rezultirala je ublažavanjem hipertrofije leve komore. Tretiranje neonatalnih kardiomiocita pacova *Klotho* proteinom rezultiralo je smanjenjem RVK nastalih delovanjem indoksil sulfata. Istraživanje je takođe otkrilo da prekomerna sinteza RVK i srčana hipertrofija nastaju aktiviranjem p38 i ERK 1/2 signlnog puta (od engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*). Egzogeno administracija *Klotho* proteina dovodi do ublažavanja hipertrofije leve komore inhibiranjem p38 i ERK 1/2 signalnog puta, i smanjenom sintezom reaktivnih vrsta kiseonika [174].

Ispitivana je povezanost između nivoa *Klotho* proteina, klasičnih faktora rizika i kardiovaskularnih bolesti u grupi od 168 starijih osoba koji su u ličnoj anamnezi imali infarkt miokarda, moždani udar i bolesti koronarnih arterija, i pokazana je veća koncentracija nivoa *Klotho* proteina kod pacijenata sa ranijim infarktom miokarda [176]. Ovo ide u prilog hipotezi o postojanju kompenzatornog mehanizma *Klotho* proteina za sprečavanje razvoja patološke hipertrofije srca nakon prethodnih oštećenja [176]. Zanimljivo je da kompenzatorna proizvodnja *Klotho* proteina nije postojala kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom jer kod ovih bolesnika postoji primarno smanjena ekspresije bubrežnog *Klotho* proteina. Prvi izveštaj o smanjenim nivoima *Klotho* proteina u serumu i urinu kod bolesnika sa HBI sprovedeno je 2011. godine od strane *Hu* i saradnika [177]. Trenutno postoji dosta dokaza koji ukazuju na nedostatak *Klotho* proteina bubrežnog porekla kod HBI, kako kod ljudi i tako i na životinjskim modelima [178, 179].

2.7.1. PRIMARNI POREMEĆAJI FGF23 – *KLOTHO* ENDOKRINE OSOVINE

Primarni višak serumskog FGF23 je primećen kod osoba sa naslednim sindromom „trošenja“ fosfata, uključujući autozomno dominantni hipofosfatemijski rahitis (ADHR), X povezanu hipofosfatemiju (XLH) i autozomno recesivni hipofosfatemijski rahitis (ARHR) [180-182]. Ovi pacijenti imaju izrazito visoke nivoe FGF23 u serumu koji su povezani sa hipofosfatemijom i niskim nivoima aktivnog vitamina D u serumu, što dovodi do neadekvatne mineralizacije kostiju (odnosno rahitisa ili osteomalacije) i dovodi do bolova u kostima ili deformacije donjih ekstremiteta.

ADHR je uzrokovan mutacijama u FGF23 koje čine protein FGF23 otporan na proteolitičko delovanje, što rezultira visokim nivoom intaktnog FGF23 u serumu [180]. Pacijenti sa XLH nose mutaciju koja rezultira pojačanom ekspresijom FGF23, onemogućena je proteolitička razgradnja FGF23, ali mehanizam je nepoznat [183]. Pacijenti sa ARHR nose mutacije u genu koji kodira fosfoprotein 1 kiselog dentin matriksa, protein koštane matrice koji se specifično eksprimira u osteocitima [105]. Konačno, sporadični primarni višak serumskog FGF23 se takođe primećuje kod pacijenata sa tumorom koji izaziva osteomalaciju, koji stvaraju FGF23 i razviju simptome slične onima koji su opaženi kod pacijenata sa naslednim sindromom „trošenja“ fosfata [111].

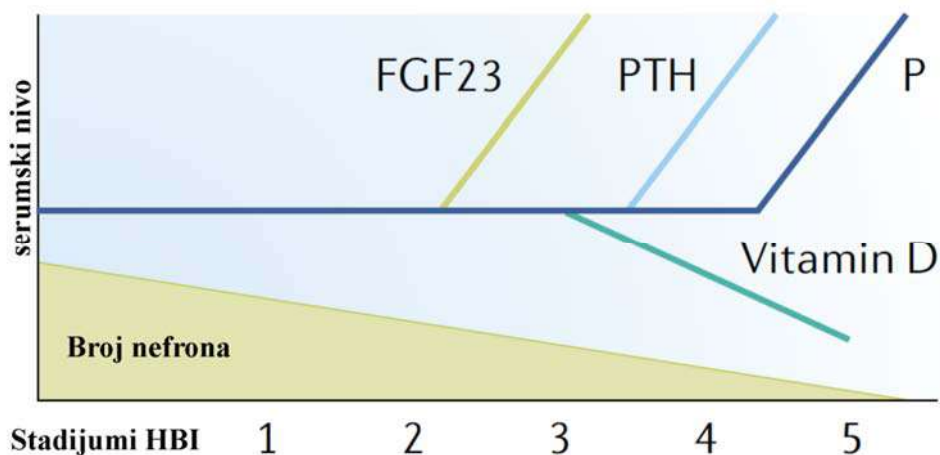
Primarni deficit serumskog FGF23 primećen je kod pacijenata sa porodičnom tumorskom kalcinozom (FTC) [183, 184]. Mutacije dovode do povećane razgradnje FGF23, što dovodi do niskog nivoa FGF23 u serumu, koje dovode do ektopičnih kalcifikacija koje su povezane sa visokim nivoom fosfata i aktivnim vitaminom D.

Do danas su opisane mutacije u/ili blizu gena *Klotho* kod dva pacijenta. Jedan od ovih pacijenata imao je homozigotnu mutaciju (H193R) u *Klotho* genu, koja je dovela do gubitka funkcije proteina, jer je pacijent razvio simptome koji podsećaju na FTC [185]. Mutacija kod drugog pacijenta bila je translokacija sa tačkom prekida blizu *Klotho* gena, a ovaj pacijent je imao hipofosfatemiju koja je bila povezana sa visokim serumskim nivoima FGF23 i PTH [186]. Ovaj pacijent je imao visoke nivoe rastvorljivog α *Klotho* u serumu. Interesantno je da miševi kod kojih je dokazana ekspresija rastvorljivog α *Klotho* iz adenovirusnog vektora takođe razvijaju

hipofosfatemiju koja je povezana sa visokim nivoima FGF23, iako mehanizam kojim rastvorljivi *Klotho* povećava nivo FGF23 ostaje da se utvrdi [187].

2.7.2. MINERALNO-KOŠTANI METABOLIZAM I PROGRESIJA BUBREŽNE SLABOSTI

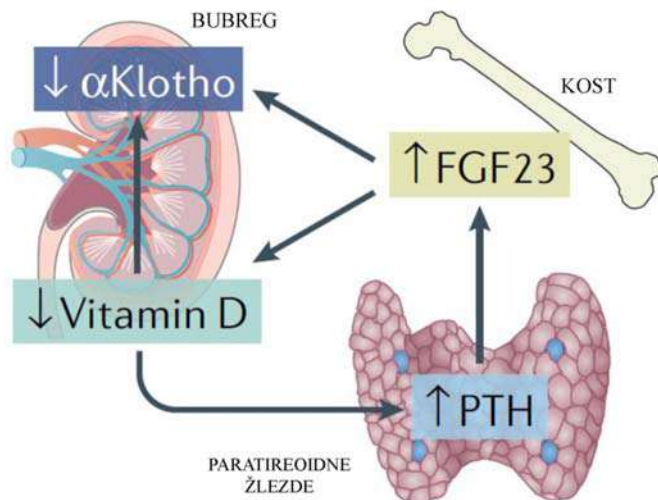
Sekundarni višak serumskog FGF23 je primećen kod svih bolesnika sa hroničnom bubrežnom bolešću [129]. Bez obzira na uzrok oštećenja bubrega, broj funkcionalnih nefrona se smanjuje kako napreduje HBI. Kako se broj nefrona takođe smanjuje i kao posledica prirodnog starenja, HBI se može posmatrati kao faktor koji značajno ubrzava starenje bubrega [188, 189].



Slika 10 | Parametri mineralno-koštanog metabolizma i progresije HBI
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [151])

Ako se ne smanji unos fosfata, smanjenje broja nefrona koje je rezultat starenja ili HBI zahteva povećanje izlučivanja fosfata po nefronu kako bi se održao balans fosfata. Ovo povećano izlučivanje fosfata postiže se porastom ekspresije FGF23, što rezultira povećanjem nivoa FGF23 u serumu sa progresijom HBI [53, 190]. Povećanje FGF23 snižava nivo aktivnog vitamina D u serumu, nakon čega sledi porast nivoa PTH. Ove promene koje su primećene sa progresijom HBI stvaraju profil hormona koji je karakterističan za CKD – MBD (Slika 10) [129]. Visoki nivo PTH dodatno povećava nivo FGF23, što rezultira daljim padom nivoa aktivnog vitamina D, a visok nivo FGF23 i snižen nivo aktivnog vitamina D suzbijaju ekspresiju *Klotho* proteina. Ovo

zmanjenje *Klotho* ekspresije može izazvati otpornost na FGF23 smanjujući njegovu aktivaciju FGFR-zavisne unutarćelijske signalizacije. Smanjeni odgovor na FGF23 u bubrezima potencijalno pojačava i / ili produžava postprandijalno povećanje nivoa fosfata u krvi, što dovodi do povratne petlje koja pogoršava CKD – MBD. Na kraju, HBI napreduje do tačke u kojoj broj funkcionalnih nefrona više nije dovoljan da izluči uneseni fosfat, što rezultira postojanom hiperfosfatemijom (Slika 11).



Slika 11 | Spirala pogoršanja *Klotho* ekspresije
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [65])

PTH takođe ima fosfaturičnu aktivnost. Međutim, činjenica da porast FGF23 prethodi porastu PTH tokom progresije HBI ukazuje da je FGF23, a ne PTH, prvenstveno odgovoran za održavanje homeostaze fosfata, barem u ranim fazama HBI. Ovaj pojam potkrepljuju nalazi studije u kojoj je pacovima ubrizgavan antiserum napravljen od antitela glomerulske bazalne membrane da bi se dobio model progresije HBI [191]. Pacovi koji su imali visok nivo FGF23, nizak nivo vitamina D i visok nivo PTH, ali još uvek nisu imali hiperfosfatemiju, tretirani su neutrališućim FGF23 antitelima, što je dovelo do brzog (u roku od 24 sata) porasta serumske koncentracije fosfata i aktivnog vitamina D i smanjenja frakcione ekskrecije fosfata. Međutim, nivoi PTH i kalcijuma u serumu su ostali nepromenjeni, a tek 48 sati nakon tretmana antitelom došlo je do smanjenja serumskog nivoa PTH i porasta koncentracije kalcijuma. Ovi nalazi pokazuju da je FGF23, a ne PTH, prvenstveno odgovoran za održavanje nivoa fosfata u serumu unutar fiziološkog raspona i da je porast nivoa PTH nastao kao odgovor na niske nivoe aktivnog

vitamina D i kalcijuma u serumu. Fosfaturična aktivnost FGF23 proizilazi iz njegove sposobnosti da povećava izlučivanje fosfata po nefronu smanjenjem reapsorpcije fosfata u proksimalnim tubulima, pri čemu pojačano izlučivanje fosfata izaziva oštećenje bubrežnih tubula [192, 193]. Studija iz 1980. koristila je model delimične nefrektomije pacova da bi pokazala korelaciju između stepena oštećenja tubula u preostalom bubregu i izlučivanja fosfata po nefronu kada izlučivanje fosfata premaši $\sim 1,0 \mu\text{g} / \text{dan}$ (fiziološki nivo fosfatne ekskrecije je $\sim 0,5 \mu\text{g} / \text{dan}$) [193]. Iako FGF23 nije otkriven u vreme ove studije, nivo FGF23 u serumu verovatno bi mogao poslužiti kao surogat za izlučivanje fosfata po nefronu i tako bi bio u korelaciji sa stepenom oštećenja bubrega.

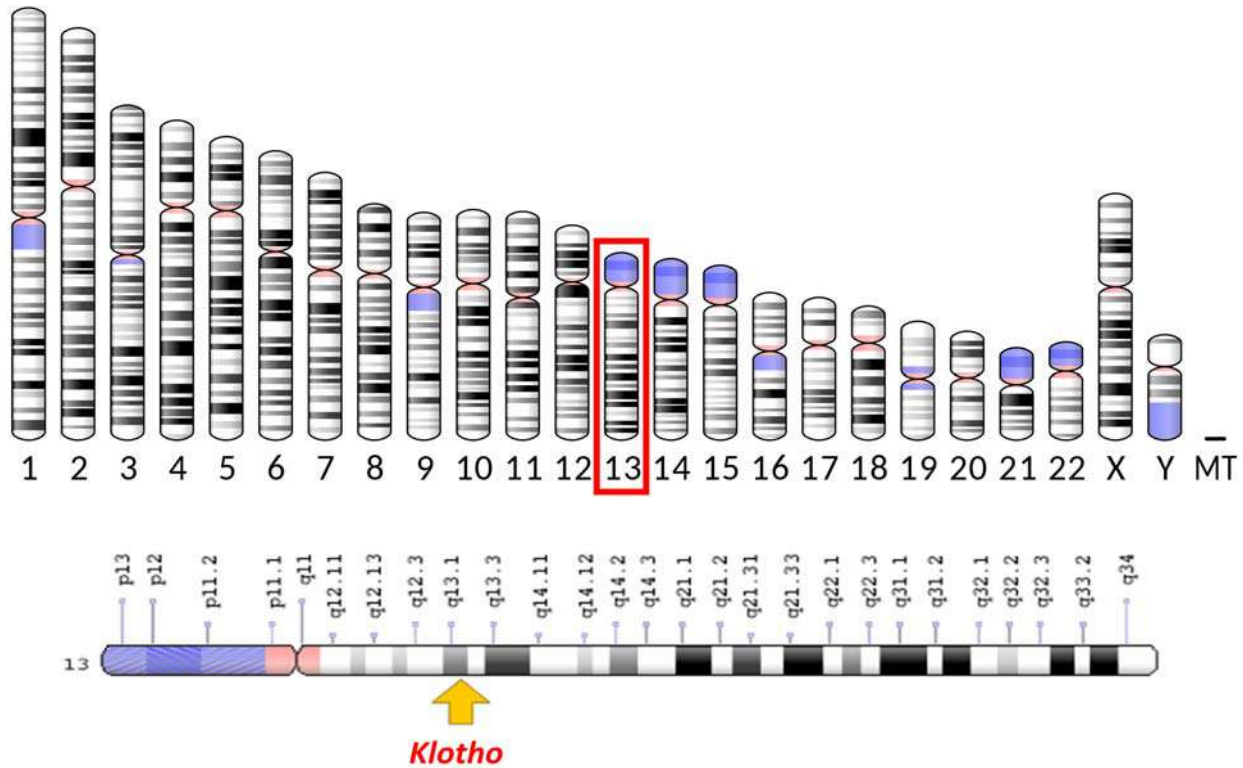
Bubrezi su glavni izvor *Klotho* proteina, stoga je hronična bubrežna insuficijencija stanje *Klotho* deficita [177]. Bolesnici sa bubrežnom bolešću pokazuju smanjenu *Klotho* ekspresiju već u ranima stadijumuma HBI [108]. Deficit *Klotho* proteina je jedan od prvih mineralno koštanih poremećaja koji se javljaju kod bolesnika sa HBI. Kako bolest napreduje, koncentracija *Klotho* proteina dalje opada, uzrokujući otpornost FGF23, a samim tim dolazi do povećanja serumske koncentracije FGF23 i paratireoidnog hormona, odnosno smanjenja serumske koncentracije kalcitriola [108]. Mnoge od ovih promena čine bolesnike sa HBI podložnim za razvoj vaskularnih kalcifikacija. Sve više dokaza upućuju na to da nedostatak *Klotho* proteina može doprineti nastanku vaskularnih kalcifikacija [177].

Vaskularne kalcifikacije nastaju kao posledica strukturno-funkcionalnih promena u zidu krvnog suda. Kod bolesnika sa HBI se razlikuje od promena na krvnim sudovima u opštoj populaciji. Kod bolesnika sa očuvanom bubrežnom funkcijom promene se dešavaju u intimi aterosklerotskih plakova, dok kod pacijenata sa HBI promene nastaju u tuniki mediji [194, 195]. Zahvataju endotelne i vaskularne glatko-mišićne ćelije koje su stimulisane inflamacijom niskog stepena. Pomenute promene se dešavaju u medijalnom sloju zida krvnog suda, ali u predelu endotelnih ćelija [196, 197]. Do nedavno se smatralo da su vaskularne kalcifikacije posledica pasivnog taloženja kalcijumovih soli, međutim sada se zna da se radi o složenom procesu. Proinflamatorni medijatori (angiotenzin II, metaloproteinaze, $\text{TNF}\alpha$, RVK) pokreću infamaciju niskog stepena i dovode do promena na glatko-mišićnim i endotelnim ćelijama. Endotelne ćelije se podvrgavaju apoptozi i starenju. Vaskularne glatko-mišićne ćelije se razmnožavaju i migriraju

u subendotelni prostor, povećava se sinteza kolagena i ekstraćelijskog matrikasa. Naredni metabolički stres dovodi do ponovne apoptoze, nastavka procesa starenja i degradacije elastinskih vlakana. Glatko-mišićne ćelije prolaze fenotipsku diferencijaciju u ćelije koje podsećaju na osteoblaste koje su uključene u procesu vaskularnih kalcifikacija.

2.8. POLIMORFIZAM *KLOTHO* GENA

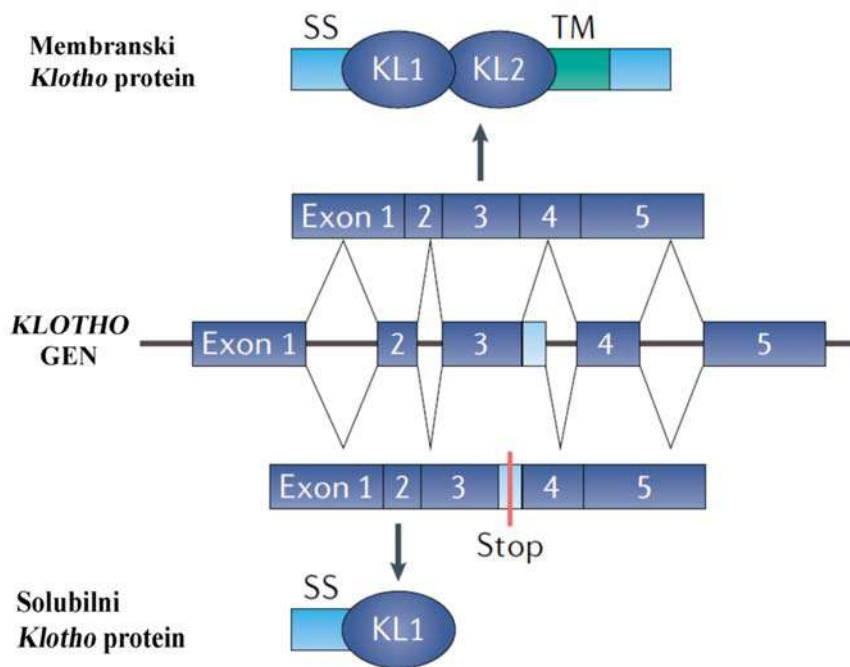
Klotho gen nalazi se na 13q hromozomu ljudskog genoma, obuhvata približno 50 kbp, sastoji se od promotorskog regiona, pet egzona i četiri introna, i odgovoran je za sintezu membranskog i izlučenog *Klotho* protein [74].



Slika 12 | Lokacija *Klotho* gena homanog genotipa
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [198])

Identifikovan je prvi put 1997. godine, od strane *Kuro*-a i saradnika. *Klotho* gen visoko korelira sa supresijom nekoliko fenotipova starenja. Ime gena / proteina dolazi iz grčke mitologije – *Cloto*, jedne od tri boginje sudbine, koja je bila odgovorna za nit života, ona prede i vrti nit života [63, 82]. Studije su pokazale da ubacivanje transgena dovodi do sindroma nalik starenju kod miševa sa *Klotho*^(kl⁻/kl⁻) nedostatkom [106]. Ubačena mutacija smeštena u 5' bočnom regionu rezultira brisanjem 8 kbp, 6 kbp ushodno od start mesta za transkripciju. Zbog toga, kodirajuća sekvenca *Klotho* gena nije promenjena, već dolazi samo do promene u ekspresiji gena. Poremećaj ekspresije *Klotho* gena kod miševa praćen je kraćim životnim vekom, neplodnošću, aterosklerozom, osteoporozom, promenama na koži i ektopičnim kalcifikacijama [74, 106]. U uzrastu od 3 do 4 nedelje, životinjski modeli pokazuju zaostajanje u rastu i obično umiru u

periodu od 8–9 nedelja [106]. Ekspresija *Klotho* gena primećuje se uglavnom u bubrezima i mozgu, kao i u hipofizi, placenti, skeletnim mišićima, mokraćnoj bešici, aorti, pankreasu, testisima, jajnicima, debelom crevu i štitnoj žlezdi [74, 106, 199].



Slika 13 | Struktura *Klotho* gena
(preuzeto i adepirano na osnovu reference [65])

Zamene jednog nukleotida u molekulu DNK su tačkaste mutacije prisutne u genima i označavaju se kao SNP (od engl. *single nucleotide polymorphism*). Inače, SNP imaju učestalost veću od 1% u opštoj populaciji i mogu biti prisutni u kodirajućim sekvencama gena, nekodirajućim regionima, ali i u regionima među genima (engl. *inter-genic region*) [200]. Do sada je otkriveno više do 10 SNP u humanom *Klotho* genu. Karakteriše ih veliki stepen plejotropnosti i povezanost sa bubrežnim bolestima, bolestima koronarnih arterija, moždanim udarom i smanjenom gustinom kostiju [201].

KL-VS alel *Klotho* gen, je uobičajeni haplotip u opštoj populaciji. Definisan je prisustvom 6 SNP u egzonu 2. Tri mutacije *Klotho* gena u egzonu 2 uključuju dve supstitucije aminokiselina (F352V, C370S) i jednu tihu mutaciju (K385K). KL-VS nosioci imaju promene u metabolizmu i aktivnosti *Klotho* proteina, na nivou fenotipa postoji povezanost sa starenjem i skraćenim

životnim vekom kod homozigotnih nosioca [202-206]. Takođe utiče na inteligenciju i kognitivne funkcije kod čoveka [203, 204]. KL-VS može biti marker povećanog rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, obzirom da studije naglašavaju važnost ovog polimorfizma za rano javljanje bolesti koronarnih arterija [206, 207]. Takođe, KL-VS je povezan sa povećanim nivoom lipoproteina visoke gustine, sistolnim krvnim pritiskom i povećanim rizikom od moždanog udara. Ovo podržava hipotezu povezanosti *Klotho* sa aterosklerozom [206, 207]. Drugi reprezentativni SNP u 4. intronu (rs650439), takođe se dovodi u vezu sa aterosklerozom kod hipertenzivnih pacijenata [208].

Poslednjih godina otkrivene su nove varijacije u genu za *Klotho* protein, kao što su SNP G395A koji se nalaze u promotoru i C1818T u 4. egzonu. Njihov potencijalni značaj ogleda se u činjenici da je veliki broj studija pokazao njihovu povezanost sa kardiovaskularnim oboljenjima. Takođe je pokazana njihova veza sa poremećajima mineralno-koštanog metabolizma, odnosno povezanost sa hiperkalcemijom, hipofosfatemijom, fosfaturijom i niskom gustinom kostiju [204, 209, 210]. Polimorfizam G-395A (rs1207568) u promoterskom regionu *Klotho* gena dovodi se u vezu sa kardiovaskularnim poremećajima, pogotovo kod bolesnika sa HBI. GG predstavlja divlji tip genotipa, dok GA i AA predstavljaju mutantne genotipove. A je mutantni alel za polimorfizam G-395A [211]. Utvrđeno je da G395A polimorfizam može biti nezavisan faktor rizika za razvoj bolesti koronarnih arterija [210]. Interesantno je da se češće prisustvo A alela G395A nije pojavilo kod pacijenata sa vazospastičnom anginom, što ukazuje da polimorfizam može biti povezan sa aterosklerozom [210]. Slično tome, u korejskoj studiji koja je pratila zdrave žene postojala je povezanost između varijacija *Klotho* gena i kardiovaskularnih faktora rizika [212]. Analiza je pokazala veći prosečni sistolni krvni pritisak kod G395A nosilaca i viši nivou glukoze u plazmi kod C1818T, što predstavlja povećanu opasnost od kardiovaskularnih komplikacija [212]. Istraživanje *Elghorouri* i saradnika (2018) dokazalo je vezu između polimorfizma G395A i kardiovaskularnih komplikacija [213]. Poznato je da krajnji stadijum bubrežne bolesti (ESRD) često dovodi do promena na srcu. Ispitivana grupa obuhvatala je pedijatrijske pacijente sa hroničnom bubrežnom bolešću, kod koje su praćene kardiovaskularne komplikacije: hipertrofija leve komore i kardiomiopatija. Rezultati su pokazali veću učestalost A alela G395A kod pacijenata sa ESRD i hipertrofijom leve komore. U suštini, ovi nalazi su

potvrdili povezanost G395A polimorfizma sa kardiovaskularnim komplikacijama kod bolesnika u ESRD [213].

Predstavljeni podaci pokazali su važnost polimorfizama *Klotho* gena i pojave ateroskleroze, bolesti koronarnih arterija ili hipertrofije leve komore. Stoga bi se alel A mogao smatrati faktorom rizika za kardiovaskularne događaje.

*
* *

Postoji vrlo malo studija koji ukazuju na antioksidativno i antiapoptotsko delovanje *Klotho* proteina. Takođe, utvrđeno je da *Klotho* ima važnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, posebno u očuvanju integriteta srčanog i vaskularnog tkiva. *Klotho* je uključen u mehanizme odbrane od hipertrofije srca i remodelovanja, kao i vaskularnih kalcifikacija i aterogeneze. Mnoge studije su pokazale da deficit *Klotho* proteina ili polimorfizam *Klotho* gena mogu biti faktori rizika za najzastupljenije kardiovaskularne bolesti. Zbog toga regulacija FGF23/*Klotho* osovine i njihova ekspresija u kardiomiocitima mogu biti od suštinskog značaja za ćelijski metabolizam, pravilno funkcionisanje srca i zaštitu od nekih poremećaja. Na kraju, čini se verovatnim da aktivnost *Klotho* proteina može imati zaštitni efekat u oštećenom tkivu miokarda, ali i novo “target” mesto za lečenje kardiovaskularnih poremećaja uopšte, a pogotovo kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom i na dijalizi.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uprkos sveobuhvatnom napretku medicine, tehničkom poboljšanju hemodijaliznih mašina, unapređenju farmakološkog pristupa, stopa smrtnosti bolesnika na hroničnom programu hemodijalize je izuzetno visoka. Kardiovaskularne bolesti su u više od 50% slučajeva neposredni uzrok smrti [1, 214]. Uglavnom postoje strategije za rešavanje tradicionalnih faktora rizika za kardiovaskularne bolesti, kao što su hipertenzija, hiperlipidemija, šećerna bolest i gojaznost, dok za takozvane netradicionalne faktore rizika, gde spadaju mineralno-koštani poremećaji, još uvek nema jasnih preporuka.

Na osnovu podataka iz literature može se istaći veliki značaj *Klotho* proteina u homeostazi mineralnog metabolizma i njegov uticaj na endokrinu aktivnost FGF23 kod bolesnika sa HBI na HD. Poznavanje ovih odnosa je od suštinskog značaja za proučavanje varijacija u *Klotho* genu koje mogu delimično da objasne razlike u nivou proteina, životnom veku i njegovoj funkciji. Bolje poznavanje molekularnih mehanizama omogućilo bi primenu *Klotho* proteina kao novog terapijskog sredstva za prevenciju progresije hronične bubrežne insuficijencije i poboljšanje kardiovaskularnog statusa [215]. Poznavanje populacione genetike je veoma važno, pa i u domenu povezanosti mineralno-koštanog metabolizma i kardiovaskularnih komplikacija kod bolesnika na hemodijalizi, na osnovu čega bi se sprovele nacionalne strategije u rešavanju ovog problema.

Još osamdesetih godina prošlog veka ehokardiografske studije su identifikovale negativne strukturne promene na srcu kod bolesnika na hemodijalizi koje su nazvane uremijska kardiomiopatija. Danas su nove ehokardiografske tehnike omogućile analizu suptilnih subkliničkih promena u srčanoj geometriji i funkciji [216]. Ove promene mogu da predvide buduće kardiovaskularne događaje, što je od velikog značaja kod bolesnika na hemodijalizi, a sve sa ciljem sprečavanja negativnih ishoda.

Imajući u vidu pomenute patofiziološke mehanizme, glavni cilj ovog istraživanja je ispitivanje povezanosti varijacija u genu za *Klotho* protein, parametara mineralno koštanog metabolizma i ehokardiografskih karakteristika bolesnika na hemodijalizi.

Konkretni ciljevi istraživanja su:

- Odrediti koncentraciju standardnih parametara mineralno-koštanog metabolizma (kalcijuma, fosfora, paratireoidnog hormona, alkalne fosfataze), vitamina D, FGF23 i *Klotho* proteina kod bolesnika na hemodijalizi i ispitanika iz kontrolne grupe.
- Ispitati učestalosti alela i genotipova polimorfizama u genu za *Klotho* protein; SNP *Klotho* G-395A i SNP *Klotho* C1818T, kod bolesnika na hemodijalizi i ispitanika iz kontrolne grupe.
- Ispitati postojanje razlika u koncentraciji standardnih parametara mineralno-koštanog metabolizma, vitamina D, FGF23 i *Klotho* proteina kod bolesnika sa različitim genotipovima ispitivanih polimorfizama.
- Ispitati distribuciju različitih tipova morfologije leve komore srca, kod bolesnika na hemodijalizi sa različitim genotipovima ispitivanih polimorfizama.
- Ispitati potencijalnu prediktivnu vrednost pojedinih parametara mineralno-koštanog metabolizma za nastanak ehokardiografskih promena kod bolesnika na hemodijalizi.
- Pratiti stopu mortaliteta bolesnika na hemodijalizi (opšteg i kardiovaskularnog) i povezanost preživljavanja sa varijacijama u genu za *Klotho* protein, parametrima mineralno-koštanog metabolizma i geometrijom leve komore bolesnika na hemodijalizi.

4. PACIJENTI I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je obavljeno na Klinici za nefrologiju Univerzitetskog kliničkog centara u Nišu: Odeljenje za dijalizu (odsek za hemodijalizu), Odeljenje za prijem bolesnika, specijalističko-konsultativnu delatnost i dijagnostiku (odsek za laboratorijsku i ultrazvučnu dijagnostiku); Medicinskom fakultetu u Nišu: Institut za biohemiju i Naučnoistraživački centar za biomedicinu (laboratorija za funkcionalnu genomiku i proteomiku i laboratorija za hromatografiju); Klinici za kardiovaskularne bolesti Univerzitetskog kliničkog centara Niš: Odeljenje za hitne prijeme bolesnika, specijalističko-konsultativnu delatnost i dijagnostiku (odsek neinvazivne dijagnostike). U toku rada su poštovani principi medicine zasnovane na dokazima (Evidence Based Medicine). Istraživanje je koncipirano kao prospektivna studija u trajanju od pet godina.

4.1. PACIJENTI

Ciljna grupa istraživanja bili su bolesnici u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji na hroničnom programu hemodijalize (bolesnici koji se dijaliziraju duže od 91 dan u kontinuitetu). Uključeno je 142 bolesnika i 80 ispitanika iz kontrolne grupe sa očuvanom bubrežnom funkcijom, odnosno JGF > 60 ml/min/1,73 m². Kontrolnu grupu su činili ispitanici koji su u pogledu polne i starosne distribucije bili podudarni sa bolesnicima na hemodijalizi. U studiju nisu uključeni ispitanici koji se dijaliziraju kraće od 91 dan, ispitanici mlađi od 18 godina, bolesnici koji su u toku istraživanja promenili modalitet lečenja ili promenili dijalizni centar. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu, odluka broj 12-12123-1.

Za istraživanje je korišćen serum i DNK bolesnika sa hroničnog programa hemodijalize i ispitanika iz kontrolne grupe. U istraživanju je korišćen uzorak krvi, koji se bolesnicima uzima isključivo prilikom rutinske kontrole u cilju redovnog paraćenja biohemijskih parametara bolesnika na hemodijalizi. Uzimanje krvi je vršeno venepunkcijom nakon 20 minuta odmora, pre započinjanja dijalizne procedure i pre davanja heparina. Uzorkovanje krvi ispitanika iz kontrolne grupe vršeno u unapred dogovorenom terminu. Za uzorkovanje primenjujane su sterilne jednokratne vakumirane epruvete. Krv za izolaciju DNK i hematološke analize je uzorkovana u epruvete od 3 ml sa EDTA kao antikoagulantom. Krv za ostale analize je uzorkovana u epruvete bez antikoagulantnog sredstva. Pre uzorkovanja krvi, od svakog ispitanika pojedinačno je dobijen informisani pristanak u skladu sa preporukama Helsinške deklaracije.

4.2. METODE

4.2.1. Rutinske laboratorijske metode

Rutinske hematološke analize rađene su na hematološkom analajzeru Nihon Koden, Tokyo, Japan, u laboratoriji Klinike za nefrologiju Kliničkog centra Niš.

Rutinske biohemijske analize su rađene na automatskom biohemijskom analajzeru Erba XL-600, proizvođača Erba diagnostics Mannheim, GmbH, Germany, u laboratoriji Klinike za nefrologiju Kliničkog centra Niš.

CRP je određivan imunoturbidimetrijskim testom, na automatskom analajzeru Olympusu AU-400, proizvođača Olympus Diagnostic, GmbH, Germany, izražavaće se u mg/l, u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Niš.

Određivanje nivoa intaktnog paratireoidnog hormona vršeno je imuno-radiometrijskom analizom (IRMA) na LKB gama brojaču, LKB Institute, Victoria, Australia, u Centru za nuklearnu medicinu Kliničkog centra Niš.

4.2.2. Određivanje koncentracije *Klotho* proteina

Određivanje koncentracije *Klotho* proteina vršeno je iz seruma ELISA metodom pomoću komercijalnog kita za kvantitativno određivanje humanog solubilnog α -*Klotho* proteina iz seruma, proizvođača Cusabio Biotech, Wuhan, China. Dobijene vrednosti su izražene pg/ml.

4.2.3. Određivanje koncentracije fibroblastnog faktora rasta 23

Određivanje koncentracije FGF23 vršeno je iz seruma ELISA metodom pomoću komercijalnog kita za kvantitativno određivanje humanog FGF23 iz seruma proizvođača Cusabio Biotech, Wuhan, China. Dobijene vrednosti su izražene pg/ml.

4.2.4. Određivanje koncentracije vitamin D na HPLC-u

Koncentracija vitamina D (25-hidroksi vitamin D₃) određivana je HPLC metodom po modifikovanoj metodi Turpeinen i saradnika [217].

Postupak pripreme uzorka: u 500 µl seruma se dodaje 500 µl acetonitrila, zatim se vrši vorteksiranje na 1000 o/min 15s i centrifugiranje 5 minuta na 8000 rpm, a potom se dodaje 1 ml heksana i ponovo vrši vorteksiranje 1 minut 6000 o/min. Nakon toga, 900 µl mešavine se uparava azotom (aparatus Simple concentrator). Za rastvaranje se dodaje 75 µl acetonitrila, a zatim se vorteksira 15s, 1000 o/min. Tako pripremljen uzorak se prebaci u tubicu od 1,5 mL (ependorficu).

HPLC uslovi: Kolona: Purospher STAR PR – 18e, 3,0 x 125 mm, 3 µm, Merck, Darmstadt Germany. Mobilna faza: A: MeOH5%, B: acetonitril 95%. Protok: 0,4 ml/min. Temperatura kolone: 30°C. Volumen injektovanja: 25 µl. Detekcija: UV 265 nm.

Standard: 25 – hidroksi vitamin D₃ monohidrat (25 – hidrixyvitamin D₃ monohidrate), proizvođača Sigma ALDRICH Co, 3050 Spn, Sigma ALDRICH CHEME GmbH, ≥99,0% (HPLC). Prvo je napravljen rastvor C=1 mg/mL (1000 µg/mL), a zatim od njega rastvor C=100 ng/ml.

4.3. Izolacija DNK

Iz uzorka pune krvi, 200 µl krvi je korišćeno za izolaciju DNK uz pomoć Genomic DNA Purification Mini Kit-a (Fermentas, Thermo Scientific, Litvanija) prema uputstvu proizvođača.

4.3.1. Metoda genotipizacije SNP G395A u genu za *Klotho* protein

Modifikovana metoda Shimoyama i saradnika [218] je korišćena za određivanje polimorfizma G-395A u genu za *Klotho* protein. U osnovi ove metode je PCR-CTPP (engl. polymerase chain reaction - confronting 2-pair primers), koju karakteriše reakciona smeša kojoj su dodata 4 prajmera, dva nishodna (Fwd1, Fwd2, engl. Forward primer 1, Forward primer 2) i dva ushodna (Rev1, Rev2, engl. Reverse primer 1, Reverse primer 2).

Reakciona smeša (za svakog pojedinog ispitanika) u ukupnom volumenu od 25 µl sadržala je 12 µl komercijalnog miksa KAPA2G ReadyMix (KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit; Kapa BioSystems, Boston, Massachusetts, United States), koji u sebi sadrži Hot Start DNA polimerazu, dNTPs, MgCl₂ i stabilizatore, zatim 0,5 µl svakog od prajmera, 10 µl dejonizovane vode i 0,5 µl prethodno izolovane DNK (prosečne koncentracije 50 ng/µl). Sekvence prajmera bile su: za Fwd1: 5'-GAT CCC GCC CCC AAG TCG GGA-3', za Fwd2: 5'- GTC CCT CTA GGA TTT CGG CCAG-3', za Rev1: 5'-GTT TCG TGG ACG CTC AGG TTC ATT CTC-3' i Rev2: 5'-GAG AAA AGG CGC CGA CCA ACT TTC-3'. Za umnožavanje je korišćen program prema uputstvu proizvođača komercijalnog miksa, a koji je standardizovan u skladu sa uslovima našeg rada: inicijalna denaturacija na temperaturi od 95C° u trajanju od 1 min, nakon čega sledi 35 ciklusa: denaturacija na temperaturi od 95C° u trajanju od 30s, hibridizacija (engl. annealing) na 67C° u trajanju od 30s i elongacija na temperaturi od 72C° u trajanju od 30s. Program se završava terminalnom elongacijom na 72C° u trajanju od 1 min (finalna ekstenzija), radi kompletiranja parcijalno sintetisanih PCR produkata.



Slika 14 | Fotografija 2% agaroznom gelu, nakon horizontalne elektroforeze za detekciju SNP *Klotho* G-395A

Vizuelizacija PCR produkata vršena je na 2% agaroznom gelu obojenog etidijum bromidom (20 µl etidijum bromida u 200 ml 1x TBE pufera), nakon horizontalne elektroforeze u trajanju od 60 min, voltaža 100V. Prajmeri za SNP G-395A *Klotho* ograničavaju segmente DNK sledećih dužina: za GG genotip 252, 175 bp, za GA genotip 252, 175, 121 bp i za AA genotip 252, 121 bp.

4.3.2. Metoda genotipizacije SNP C1818T u genu za *Klotho* protein

Za genotipizaciju SNP C1818T u *Klotho* genu korišćena je ista PCR-CTPP metoda sa prajmerima: Fwd 1: 5'- TC AGT TTA CCG ACC TGA ATG TTT ACCTG - '3 i Fwd 2: 5'- CAG ATC GCT TTA CTC CAG GAA ATG CA -'3 i Rev 1: 5'-GTC CAG GGA GAA GCG AAA ATG TGT AACA-'3 i Rev 2: 5-GAG CTC TTG AAA GCA CAG TCG GGC-'3. Za amplifikaciju je korišćen sledeći program: inicijalna denaturacija na temperaturi od 95°C u trajanju od 1 min, zatim 33 ciklusa: denaturacija 95°C u trajanju od 30s, hibridizacija na 70°C u trajanju od 30s, i elongacija na temperaturi od 72°C u trajanju od 30s. Program se završava terminalnom elongacijom na 72°C u trajanju od 1 min (finalna ekstenzija), radi kompletiranja parcijalno sintetisanih PCR produkata.



Slika 15 | Fotografija 2% agaroznom gelu, nakon horizontalne elektroforeze za detekciju SNP *Klotho* C1818T

4.4. EHOKARDIOGRAFSKI PREGLED

Kod svih bolesnika je urađen kompletan dvodimenzionalni (2D) i pulsni transtorakalni ehokardiografski pregled u kabinetu za neinvazivnu dijagnostiku na Klinici za kardiovaskularne bolesti Univerzitetskog kliničkog centara Niš, na aparatu Toshiba Powervision 6000, proizvođača ToshibaCo, Tokyo, Japan. Ehokardiografski pregled je vršio isti, iskusan ehosonografista koji prethodno nije bio upoznat sa njihovim kliničkim statusom. Određivani su parametri morfologije, geometrije i funkcije leve komore. Sva merenja i izračunavanja su rađena prema preporukama američkog i evropskog udruženja za ehokardiografiju iz 2015. godine

(American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging) [219].

Ehokardiografski kalcifikacioni skor je analiziran na osnovu preporuka *Utsunomiya* i saradnika [220]. Praćene su kalcifikacije aortne valvule, kalcifikacije mitralnog prstena i kalcifikacije korena aorte. Proračunavan je ukupni kalcifikacioni skor srca (od engl. *Total Heart Calcification score (THCs)*) čiji maksimum može da bude 3, ukoliko su uočene kalcifikacije na sva tri pomenuta mesta, odnosno minimum 0, ukoliko nisu uočene kalcifikacije.

4.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

4.5.1. Snaga studije i veličina uzorka

Za proračun veličine uzorka uzeti su rezultati istraživanja Rotondi-ja i saradnika [221] gde su računate prosečne vrednosti i standardne devijacije serumskih koncentracija *Klotho* proteina u ispitivanim grupama. Za proračun je korišćeno dvosmerno testiranje nulte hipoteze nezavisnim t-testom uz prihvaćene vrednosti verovatnoće greške prvog tipa $\alpha=0,01$ i snage studije od 0,9. Ukupan studijski uzorak iznosi minimalno 62 ispitanika, po 31 ispitanik u svakoj grupi. Izračunavanje veličine uzorka je izvršeno u internet aplikaciji za određivanje veličine uzorka (<http://powerandsamplesize.com/Calculators/Compare-2-Means/2-Sample-Equality>).

4.5.2. Statistička analiza

Dobijeni podaci su prikupljeni u Excel bazu podataka, sređeni i predstavljeni tabelarno i grafički. Od osnovnih deskriptivnih statističkih parametara koristišćene su standardne statističke metode za kvalitativnu (apsolutne vrednosti i procenti) i kvantitativnu procenu (aritmetička sredina, standardna varijacija, standardan greška, minimalne i maksimalne vrednosti) dobijenih rezultata. Normalnost distribucije ispitivana je Kolomogorov Smirnovljevim testom. Za poređenje razlika između aritmetičkih sredina dveju grupa ukoliko je ispunjen uslov normalnog rasporeda korišćen je Studentov-t test, dok je u slučajevima nepravilne distribucije podataka korišćen Mann Whitney U test. U poređenje kategorijskih obeležja korišćen je χ -kvadrat test odnosno Fisher-ov test egzaktno verovatnoće. Za procenu odstupanja učestalosti alela i genotipova od Hardy-Weinberg ravnoteže korišćen je Fisher exact test. Radi utvrđivanja međupovezanosti između ispitivanih varijabli određivan je Pirsonov koeficijent proste linearne

korelacije, odnosno Spirmanov koeficijent rang korelacije u zavisnosti od distribucije podataka. Za definisanje prediktivnih faktora korišćena je regresiona analiza.

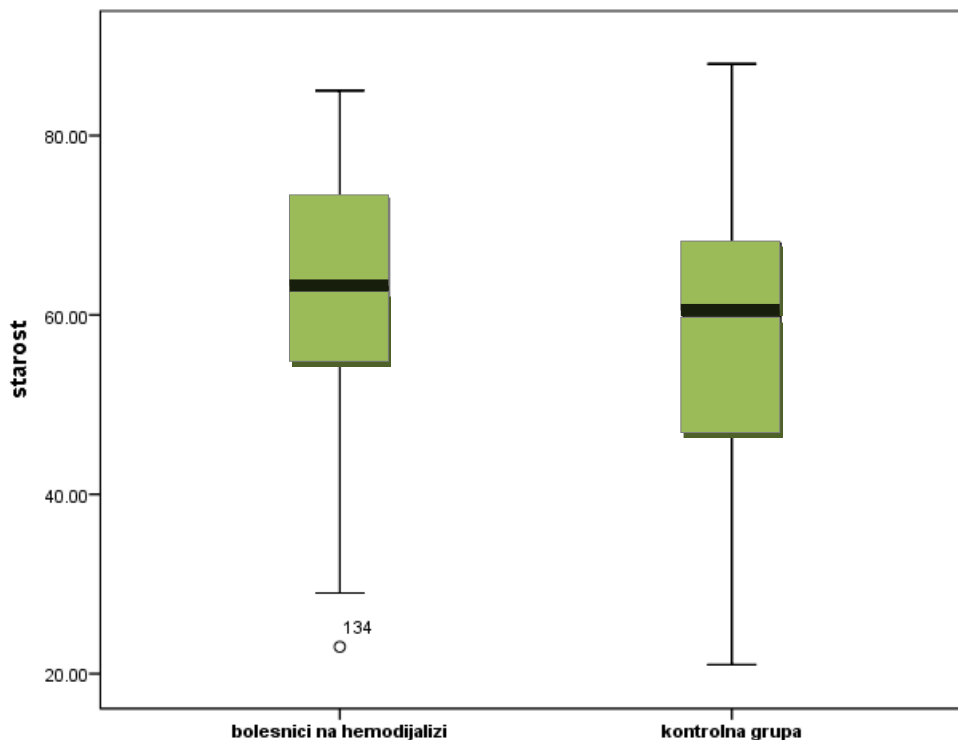
Analiza preživljavanja (engl. survival analysis) je analiza određenog događaja tokom vremena uz evidenciju trenutka kada je došlo do određenog događaja, a da je pri tome dobro definisano početno vreme praćenja. Da bi se analiza preživljavanja mogla izvesti neophodno je beležiti tačno vreme događaja. U analizi preživljavanja je formirana Kaplan-Mejerova kriva preživljavanja u odnosu na ispitivane varijable. Log rank testom je upoređivano prosečno vreme preživljavanja u odnosu na ispitivane parametre. Cox-ova regresiona analiza je korišćena radi određivanja rizik količnika (engl. Hazard Ratio – HR) za svaki od ispitivanih faktora rizika. Radi procene kalibracije modela korišćen je Hosmer-Lemeshow test. U proceni diskriminacije modela korišćena je ROC analiza. Za konstruisanje ROC krive za više varijabli logističkom regresionom analizom je formirana jedinstvena varijabla na osnovu verovatnoća više pojedinačnih varijabli. Poređenje više ROC kriva je vršeno MedCalc paketom - verzija 19.7.1, Delong-ovom metodom, gde je praćen porast površine pod krivom dodavanjem novih parametara u modele (model) - AUC (od engl. *Area Under The Curve*), kao i parametri za procenu performansi prediktivnih modela; NRI - indeks reklasifikacije mreže (od engl. net reclassification index) i IDI - integrisani indeks diskriminacije (od engl. integrated discrimination index). Statistička obrada podataka koja obuhvata metode deskriptivne statistike, Kaplan-Mejerove krive, Koksovu regresionu analizu i ROC analizu je sprovedena u programskom paketu SPSS 22.0 (SPSS Inc, Chicago Il, USA). Statistička hipoteza je testirana na nivou signifikantnosti za rizik od $\alpha=0,05$, odnosno razlika među uzorcima je smatrana značajnom ako je $p < 0,05$.

Za sređivanje reference korišćen je softverski paket EndNote X9 for Windows.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Opšte karakteristike ispitivane populacije

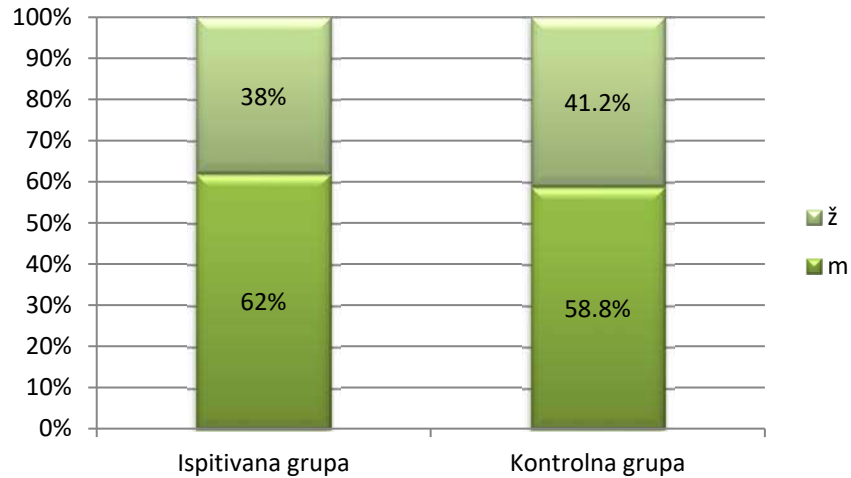
U istraživanju je učestvovalo 142 bolesnika koji su na hroničnom programu hemodijalize i 80 ispitanika koji su činili kontrolnu grupu. Prosečna starost ispitivane populacije je bila $58,15 \pm 13,59$ godina. Bolesnici na hemodijalizi su bili prosečne starosti $59,00 \pm 12,33$ godina, sa rasponom starosti od 23 do 83 godina, dok je prosečna starost kontrolne grupe iznosila $56,64 \pm 15,54$ godina, sa opsegom od 21 do 81 godine. Nije bilo statistički značajne razlike u starosnoj strukturi između ispitivanih grupa ($t=1,245$; $p=0,214$) (Grafikon 1).



Grafikon 1 | Starosna struktura ispitivanih grupa

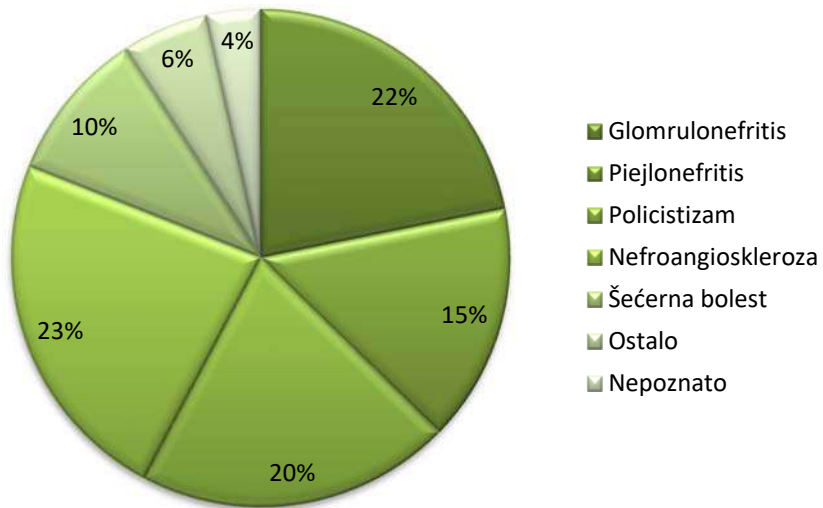
Distribucija ispitanika prema polu je bila sledeća: u grupi bolesnika na hemodijalizi bilo je 88 (62,0%) muškaraca i 54 (38,0%) žena, dok je u kontrolnoj grupi bilo 47 (58,8%) muškaraca i 33 (41,2%) žena. Nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji pola po grupama, odnosno one se mogu smatrati homogenim ($\chi^2=0,223$; $p=0,637$).

Prosečna dužina dijaliznog staža u grupi bolesnika je bila $74,63 \pm 78,44$ meseci, sa minimalnim dijaliziranjem od 3 meseca i maksimalnim od 360 meseci.



Grafikon 2 | Distribucija ispitanika prema polu

Distribucija osnovnih bolesti koje su dovele do hronične bubrežne insuficijencije u ispitanjnoj populaciji bila je sledeća: nefroangioskleroza kod 33 ispitanika (23,2%), glomerulonefritis kod 31 (21,8%) ispitanika, policistična bolest bubrega kod 29 ispitanika (20,4%), pijelonefritis kod 22 ispitanika (15,5%), šećerna bolest kod 14 ispitanika (9,9%), ostali uzroci kod 8 ispitanika (5,6%) i bolesti nepoznatog porekla kod 5 (3,5%) bolesnika (Grafikon 3).



Grafikon 3 | Distribucija osnovne bolesti kod bolesnika na hemodijalizi

5.2. Rezultati bolesika na hemodijalizi u poređenju sa kontrolnom grupom

Tabela 1. Biohemijski parametri bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

Ispitivani parametri	bolesnici n=142	kontrolna grupa n=80	p
Urea (mmol/L)	25,29±5,86	5,31±1,51	<0,001
Kreatinin (μmol/L)	799,67±200,82	82,67±10,89	<0,001
Mokraćna kiselina (mmol/L)	404,33±96,88	329,92±103,75	<0,001
Holesterol (mmol/L)	4,68±1,22	5,72±1,11	<0,001
HDL (mmol/L)	0,92±0,24	1,433±0,40	<0,001
LDL (mmol/L)	2,75±0,89	3,96±0,89	<0,001
Trigliceridi (mmol/L)	2,37±173	1,53±0,96	<0,001
Glukoza (mmol/L)	5,88±2,61	5,70±0,79	0,002
Ukupni protein (g/L)	67,13±6,89	69,73±3,95	<0,001
Albumini (g/L)	37,98±2,68	41,71±3,29	<0,001
Broj leukocita $\times 10^9/L$	6,82±1,93	6,96±1,69	0,589
Broj eritrocita $\times 10^{12}/L$	3,41±0,49	4,69±0,39	<0,001
Hemoglobin (g/L)	105,99±15,22	140,35±15,60	<0,001
Hematokrit (%)	31,62±3,96	40,50±4,06	<0,001
Broj trombocita $\times 10^9/L$	180,06±62,81	221,03±56,42	<0,001
AST (U/L)	17,93±42,63	21,17±7,29	<0,001
ALT (U/L)	19,61±13,91	18,31±8,17	0,762
GGT (U/L)	35,59±3,42	26,98±28,66	0,002
Kalijum (mmol/L)	5,86±0,82	4,77±0,46	<0,001
Natrijum (mmol/L)	137,32±11,06	138,61±9,29	<0,001

U Tabeli 1. je dat prikaz biohemijskih parametara kod bolesnika na hemodijalizi i ispitanika kontrolne grupe. Urea, kreatinin i vrednosti mokraćne kiseline su bila statistički značajno viši kod bolesnika na hemodijalizi ($Z=12,363$; $p<0,001$), ($Z=11,836$; $p<0,001$), ($t=5,228$; $p<0,001$).

Koncentracija lipidnih parametara je takođe iskazala visoko statistički značajnu razliku među grupama. Holesterol je bio značajno niži u grupi bolesnika na hemodijalizi ($t=6,241$; $p<0,001$), kao i vrednosti HDLa ($Z=9,109$; $p<0,001$) i LDLa ($Z=6,740$; $p<0,001$). Koncentracija triglicerida je bila značajno veća među bolesnicima na hemodijalizi ($Z=4,453$; $p<0,001$).

Koncentracija glukoze u krvi je bila značajno viša među bolesnicima na hemodijalizi ($Z=2,285$; $p=0,022$). Vrednosti ukupnih proteina ($Z=3,578$; $p<0,001$) i albumina ($Z=8,898$; $p<0,001$) su bile značajno niže u grupi bolesnika na hemodijalizi.

Broj leukocita je bio veći u kontrolnoj grupi ali bez statistički značajne razlike ($t=0,541$; $p=0,589$). Parametri anemije (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i nivo hematokrita) su bio statistički značajno niži među bolesnicima na hemodijalizi ($t=20,051$; $p<0,001$), ($t=16,002$; $p<0,001$), ($t=15,895$; $p<0,001$).

Koncentracija ASTa je bila značajno niža u grupi bolesnika ($Z=6,248$; $p<0,001$), dok su vrednosti ALTa bile više ali bez statistički značajne razlike ($Z=0,303$; $p=0,762$). Koncentracija GGta je bila značajno viša u grupi bolesnika na hemodijalizi ($Z=3,153$; $p=0,002$).

Nivo kalijuma je bio značajno veći među bolesnicima na hemodijalizi ($t=9,463$; $p<0,001$), dok je nivo natrijuma kod njih bio značajno niži ($Z=3,656$; $p<0,001$).

Tabela 2. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

Ispitivani parametri	bolesnici n=142	kontrolna grupa n=80	p
Fosfor (mmol/L)	1,59±0,47	1,11±0,22	<0,001
Kalcijum (mmol/L)	2,25±0,26	2,28±0,11	0,005
Ca x P	3,55±1,11	2,51±0,61	<0,001
Alkalna fosfataza (U/L)	81,29±64,36	55,34±32,84	<0,001
PTH (pg/mL)	289,51±452,23	82,73±26,92	<0,001

U Tabeli 2. su prikazane vrednosti parametara mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika na hemodijalizi i ispitanika iz kontrolne grupe. Aktivnost alkalne fosfataze i koncentracije fosfata su bile statistički značajno viša kod bolesnika na hemodijalizi ($Z=4,946$; $p<0,001$), ($Z=8,219$; $p<0,001$). Koncentracija kalcijuma je bila statistički značajno niža kod bolesnika na hemodijalizi ($Z=2,824$; $p=0,005$). Proizvod Ca x P je bio značajno veći među bolesnim osobama ($Z=7,647$; $p<0,001$).

Tabela 3. Novi parametri mineralno-koštanog metabolizma bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

Ispitivani parametri	bolesnici n=142	kontrolna grupa n=80	p
Klotho protein (pg/mL)	398,57±768,23	603,55±1302,13	0,013
FGF23 (pg/mL)	4,16±5,62	2,51±1,97	0,012
Vitamin D (ng/mL)	28,61±12,64	31,95±10,12	0,009

Poređenje novih parametra mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika i kontrolne grupe prikazano je u Tabeli 3. Koncentracija *Klotho* proteina je bila statistički značajno niža kod bolesnika na hroničnom programu hemodijalize u poređenju sa bolesnicima iz kontrolne grupe ($Z=2,480$; $p=0,013$). Koncentracija FGF23 je bila značajno viša kod bolesnika na hemodijalizi ($Z=2,523$; $p=0,012$). Koncentracija vitamina D je takođe bila značajno niža u grupi bolesnika ($Z=2,604$; $p=0,009$).

5.3. Ispitivanje učestalosti genotipova i alela *Klotho* genskih polimorfizama

Tabela 4. Učestalost genotipova i alela *Klotho* G-395A polimorfizma kod bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

<i>Klotho G-395A</i>	bolesnici n (%)	kontrolna grupa n (%)	p
A alel (AA+GA)	45(31,7)	37(46,2)	0,159
G alel (GG)	97(68,3)	43(53,8)	

U Tabeli 4. je prikazana distribucija različitih genotipova *Klotho G-395A* polimorfizma između bolesnika i kontrolne grupe. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($\chi^2=1,975$; $p=0,159$).

Tabela 5. Učestalost genotipova i alela *Klotho* C1818T polimorfizma kod bolesnika na hemodijalizi i u kontrolnoj grupi

<i>Klotho C1818T</i>	bolesnici n (%)	kontrolna grupa n (%)	p
C alel (CC)	53 (37,3)	38(47,5)	0,139
T alel (CT +TT)	89 (62,7)	42(52,5)	

U Tabeli 5. je prikazana distribucija genotipova *Klotho* C1818T polimorfizma između bolesnika na hemodijalizi i kontrolne grupe. Nije uočena statistički značajna razlika u njihovoj distribuciji ($\chi^2=2,191$; $p=0,139$).

Hardy-Weinberg equilibrium – za sve četiri grupe:

Klotho G-395A bolesnici ($\chi^2=0,398$; $p=0,528$).

Klotho G-395A kontrole ($\chi^2=0,174$; $p=0,676$).

Klotho C1818T bolesnici ($\chi^2=2,933$; $p=0,086$).

Klotho C1818T kontrole ($\chi^2=1,937$; $p=0,231$).

5.3.1. *Klotho* G-395A polimorfizam kod bolesnika na hemodijalizi

Tabela 6. Sociodemografski parametri kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* G-395A polimorfizma

Ispitivani parametri	A alel (AA+GA) n=45	G alel (GG) n=97	p
Pol (<i>muškarci/žene</i>)	33/12	55/42	0,057
Starost (<i>godine</i>)	58,76±12,49	59,11±12,32	0,873
Dijalizni staž (<i>meseći</i>)	86,73±77,04	69,02±78,75	0,033
HD start (<i>godine</i>)	48,06±16,25	53,43±13,84	0,044
Rezidualna diureza (<i>ml</i>)	248,89±358,26	370,62±468,25	0,180
Hipertenzija	37(82,2)	89(91,8)	0,095
Šećerna bolest	5(11,1)	16(16,5)	0,400
Pušenje	13(28,9)	37(38,1)	0,283
CVE*	31(68,9)	44(45,4)	0,009

*CVE kardiovaskularni događaji (koronarna arterijska bolest, moždani udar, srčana insuficijencija, hipertenzivna bolest srca, bolest perifernih arterija)

Sociodemografski podaci bolesnika na hemodijalizi u odnosu na nosioce A i G alela na genu za SNP *Klotho* G-395A su prikazani u Tabeli 6. Obe grupe su bile homogene prema starosnoj strukturi ($t=3,608$; $p=0,057$) i polu ($\chi^2=0,160$; $p=0,160$). Dužina dijaliznog staža je bila statistički značajno duža među nosiocima A alela ($Z=2,136$; $p=0,033$). Takođe, započinjanje dijalize je značajno ranije kod nosioca A alela ($Z=2,033$; $p=0,044$). Starost pri početku dijaliziranja (HD start) bila je manja među nosiocima A alela ali bez statistički značajne razlike ($Z=0,395$; $p=0,851$). Rezidualna diureza se nije značajno razlikovala po grupama ($Z=1,341$; $p=0,180$). Distribucija hipertenzije nije se statistički značajno razlikovala ($\chi^2=2,793$; $p=0,095$). Distribucija šećerne bolesti nije se statistički značajno razlikovala ($\chi^2=0,707$; $p=0,400$). Nije bilo statistički značajne razlike u procentu pušača u ispitivanim grupama ($\chi^2=1,154$; $p=0,283$). Kardiovaskularni događaji su bili zastupljeniji kod nosioca A alela ($\chi^2=6,828$; $p=0,009$).

Tabela 7. Biohemijski parametri kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* G-395A polimorfizma

Ispitivani parametri	A alel (AA+GA) n=45	G alel (GG) n=97	p
Urea (mmol/L)	24,14±5,89	25,84±5,79	0,109
Kreatinin (μmol/L)	804,25±215,45	727,55±194,79	0,845
Mokraćna kiselina (μmol/L)	399,04±104,02	406,78±93,86	0,633
Holesterol (mmol/L)	4,56±1,17	4,75±1,24	0,416
HDL (mmol/L)	0,89±0,20	0,93±0,26	0,501
LDL (mmol/L)	2,61±0,87	2,81±0,90	0,216
Trigliceridi (mmol/L)	2,21±1,23	2,43±1,91	0,952
Glukoza (mmol/L)	6,20±3,05	5,74±2,40	0,674
Ukupni protein (g/L)	67,88±3,92	66,77±7,89	0,416
Albumini (g/L)	37,67±2,63	38,12±2,71	0,337
Broj leukocita $\times 10^9/L$	6,86±1,59	6,80±2,08	0,872
Broj eritrocita $\times 10^{12}/L$	3,59±0,54	3,35±0,47	0,037
Hemoglobin (g/L)	108,96±17,59	104,62±13,97	0,114
Hematokrit (%)	32,58±4,14	31,17±3,81	0,048
Broj trombocita $\times 10^9/L$	180,52±51,38	179,86±67,60	0,757
Gvožđe (μmol/L)	13,86±15,12	12,76±11,27	0,969
UIBC (μmol/L)	24,45±8,17	25,79±7,41	0,699
TIBC (μmol/L)	37,18±6,33	37,55±7,17	0,123
Saturacija (%)	38,28±15,50	31,44±13,73	0,564
AST (U/L)	24,98±74,87	14,62±6,87	0,868
ALT (U/L)	19,61±13,91	18,31±8,17	0,825
GGT (U/L)	33,15±22,70	38,19±42,57	0,862
Kalijum (mmol/L)	5,86±0,82	4,77±0,46	0,706
Natrijum (mmol/L)	137,32±11,06	138,61±9,29	0,594
CRP (mg/L)	8,71±12,23	5,89±10,86	0,212

Poređenje biohemijskih parametara kod bolesnika nosioca A i G alela prikazani su u Tabeli 7. Utvrđena je statistički značajna razlika u broju eritrocita ($t=2,083$; $p=0,037$) i nivoa hematokrita, koji su bili značajno niži kod nosioca G alela. Ostali ispitivani parametri nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Tabela 8. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* G-395A polimorfizma

Ispitivani parametri	A alel (AA+GA) n=45	G alel (GG) n=97	p
Fosfor (mmol/L)	1,66±0,46	1,46±0,45	0,016
Kalcijum (mmol/L)	2,26±0,26	2,24±0,25	0,578
Ca x P	3,32±1,13	3,67±1,09	0,084
Ca ALB korigovni (mmol/L)	2,35±0,42	2,34±0,42	0,412
PTH (pg/mL)	334,74±623,29	268,52±347,73	0,835
Alkalna fosfataza (U/L)	87,80±93,38	78,24±45,12	0,820

Utvrđeno je da su vrednosti fosfora bile statistički značajno više među bolesnicima koji su nosioci A alela ($Z=2,400$; $p=0,016$). Vrednosti ostalih parametara se nisu značajno razlikovale: alkalna fosfataza ($p=0,820$), kalcijum ($p=0,578$), proizvod kalcijuma i fosfora ($Ca \times P$) ($p=0,084$), Ca ALB korigovni ($p=0,412$) i PTH ($p=0,835$).

Tabela 9. Novi parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* G-395A polimorfizma

Ispitivani parametri	A alel (AA+GA) n=45	G alel (GG) n=97	p
<i>Klotho</i> protein (pg/mL)	282,34±762,05	450,49±769,05	0,006
FGF23 (pg/mL)	4,93±4,07	3,07±1,89	0,031
Vitamin D (ng/mL)	30,07±11,09	27,94±13,29	0,209

U Tabeli 9. su prikazani novi parametri mineralno koštanog metabolizma, utvrđeno je da je *Klotho* protein značajno niži kod nosioci A alela ($Z=2,465$; $p=0,006$). Koncentracija FGF23 je statistički značajno veća kod nosioca A alela ($Z=2,162$; $p=0,031$). Koncentracija vitamina D je bila niža kod nosioca G alela ali bez statistički značajne razlike ($Z=1,256$; $p=0,209$).

5.3.2 *Klotho* C1818T polimorfizam kod bolesnika na hemodijalizi

Tabela 10. Sociodemografski parametri kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* C1818T polimorfizma

Ispitivani parametri	C alel (CC) n=53	T alel (CT +TT) n=89	p
Pol (<i>muškarci/žene</i>)	34/19	54/35	0,680
Starost (<i>godine</i>)	57,89±13,31	59,66±11,73	0,408
Dijalizni staž (<i>meseći</i>)	70,08±78,93	77,35±78,47	0,637
HD start (<i>godine</i>)	52,05±14,57	53,21±13,84	0,611
Rezidualna diureza (<i>ml</i>)	342,45±474,48	325,84±418,81	0,930
Hipertenzija	51(96,2)	75(84,3)	0,029
Šećerna bolest	9(17,0)	12(13,5)	0,570
Pušenje	18(34,0)	32(36,0)	0,810
CVE*	25(47,2)	52(58,4)	0,192

*CVE kardiovaskularni događaji (koronarna arterijska bolest, moždani udar, srčana insuficijencija, hipertenzivna bolest srca, bolest perifernih arterija)

Sociodemografski podaci bolesnika na hemodijalizi u odnosu na različite genotipove *Klotho* C1818T polimorfizma su prikazani u Tabeli 10. Obe grupe su bile homogene prema starosnoj strukturi ($t=0,829$; $p=0,408$) i polu ($\chi^2=0,170$; $p=0,680$). Dužina dijaliznog staža nije bila statistički značajno različita među grupama ($Z=0,473$; $p=0,637$). Starost pri početku dijaliziranja (HD start) bila je manja među nosiocima CC genotipa ali bez statistički značajne razlike ($Z=0,508$; $p=0,611$). Rezidualna diureza se nije značajno razlikovala po grupama ($Z=0,930$; $p=0,088$). Distribucija hipertenzije je bila statistički značajno zastupljenija među nosiocima CC genotipova ($\chi^2=4,750$; $p=0,029$). Distribucija šećerne bolesti nije se statistički značajno razlikovala ($\chi^2=0,628$; $p=0,570$). Nije bilo statistički značajne razlike u procentu pušača u ispitivanim grupama ($\chi^2=0,058$; $p=0,810$). Distribucija kardiovaskularnih događaja je bila homogena između ispitivanih grupa ($\chi^2=1,695$; $p=0,192$).

Tabela 11. Biohemijski parametri kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* C1818T polimorfizma

Ispitivani parametri	C alel (CC) n=53	T alel (CT +TT) n=89	p
Urea (mmol/L)	25,39±5,05	25,23±6,32	0,643
Kreatinin (μmol/L)	812,24±180,62	791,88±212,55	0,527
Mokraćna kiselina (μmol/L)	417,65±81,29	396,37±104,74	0,192
Holesterol (mmol/L)	4,85±1,41	4,59±1,08	0,411
HDL (mmol/L)	0,88±0,23	0,94±0,25	0,173
LDL (mmol/L)	2,80±0,95	2,72±0,86	0,679
Trigliceridi (mmol/L)	2,65±2,05	2,20±1,49	0,291
Glukoza (mmol/L)	5,90±3,05	5,87±2,32	0,433
Ukupni protein (g/L)	67,82±3,94	67,31±8,16	0,199
Albumini (g/L)	38,08±2,65	37,92±2,71	0,598
Broj leukocita $\times 10^9/L$	6,92±1,97	6,77±1,92	0,968
Broj eritrocita $\times 10^{12}/L$	3,41±0,47	3,41±0,51	0,871
Hemoglobin (g/L)	106,75±14,14	105,54±15,89	0,545
Hematokrit (%)	31,69±3,82	31,63±3,897	0,720
Broj trombocita $\times 10^9/L$	186,58±65,79	176,14±60,79	0,529
Gvožđe (μmol/L)	12,50±5,18	13,37±5,24	0,282
UIBC (μmol/L)	25,29±7,35	24,64±7,95	0,821
TIBC (μmol/L)	37,09±7,04	38,01±6,31	0,710
Saturacija (%)	33,98±13,91	35,93±15,07	0,513
AST (U/L)	24,98±74,87	14,62±6,87	0,576
ALT (U/L)	19,02±12,07	19,95±14,79	0,420
GGT (U/L)	37,96±40,87	35,78±35,43	0,700
Kalijum (mmol/L)	5,98±0,80	5,79±0,83	0,209
Natrijum (mmol/L)	137,82±2,07	137,01±13,89	0,394
CRP (mg/L)	8,35±15,28	5,82±8,05	0,868

U Tabeli 11. su data poređenja biohemijskih parametara kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* C1818T polimorfizma. Nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajnu razliku: urea (p=0,643), kreatinin (p=0,527), mokraćna kiselina (p=0,192), holesterol (p=0,411), HDL (p=0,173), LDL (p=0,679), trigliceridi (p=0,291), glukoza (p=0,433), ukupni proteini (p=0,199), albumini (p=0,598), leukociti (p=0,968), eritrociti (p=0,871), hemoglobin (p=0,545), hematokrit (p=0,720), trombociti (p=0,529), gvožđe (p=0,282), UIBC (p=0,821), TIBC (p=0,710), saturacija (p=0,513), AST (p=0,576), ALT (p=0,420), GGT

($p=0,700$), kalijum ($p=0,209$) i natrijum ($p=0,394$). Vrednost CRPa nije pokazala značajnu razliku u grupama ($p=0,868$).

Tabela 12. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* C1818T polimorfizma

Ispitivani parametri	C alel (CC) n=53	T alel (CT +TT) n=89	p
Fosfor (mmol/L)	1,68±0,47	1,53±0,46	0,065
Kalcijum (mmol/L)	2,26±0,26	2,24±0,25	0,807
Ca x P	3,71±1,10	3,46±1,11	0,117
Ca ALB korigovni (mmol/L)	2,36±0,44	2,34±0,41	0,899
PTH (pg/mL)	367,89±650,06	242,73±268,47	0,250
Alkalna fosfataza (U/L)	86,50±95,55	78,25±35,68	0,241

Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma nisu pokazali značajnu razliku među bolesnicima sa različitim genotipovima *Klotho* C1818T polimorfizma: alkalna fosfataza ($p=0,241$), fosfor ($p=0,065$), kalcijum ($p=0,807$), proizvod kalcijuma i fosfora (Ca x P) ($p=0,117$), Ca ALB korigovni ($p=0,899$) i PTH ($p=0,250$).

Tabela 13. Novi parametri mineralno koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* C1818T polimorfizma

Ispitivani parametri	C alel (CC) n=53	T alel (CT +TT) n=89	p
<i>Klotho</i> protein (pg/mL)	356,32±484,46	423,13±894,65	0,169
FGF23 (pg/mL)	3,20±1,99	3,92±3,28	0,526
Vitamin D (ng/mL)	30,18±13,61	27,68±11,99	0,352

U Tabeli 13. su prikazani novi parametri mineralno-koštanog metabolizma, nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajnu razliku između dve grupe bolesnika: *Klotho* protein ($Z=1,377$; $p=0,168$), FGF23 ($Z=0,634$; $p=0,526$) i vitamin D ($Z=0,930$; $p=0,352$).

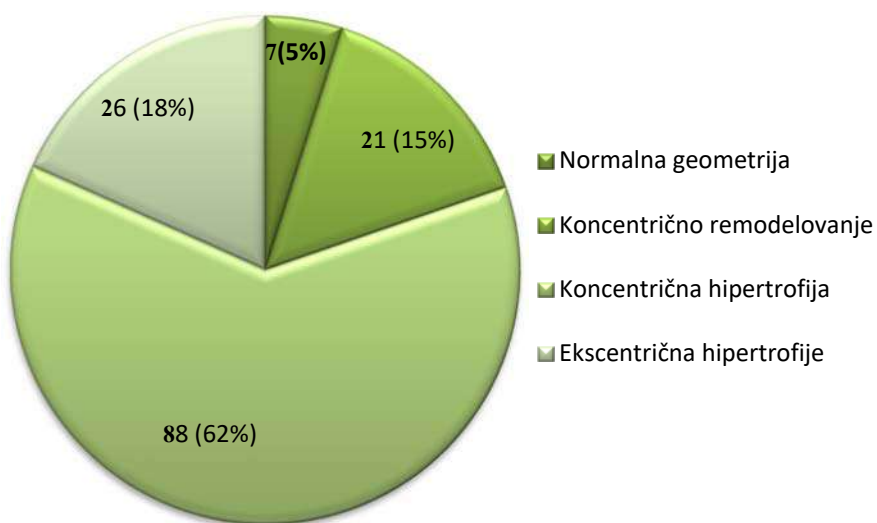
5.4. Morfologija leve komore srca kod bolesnika na hemodijalizi

Tabela 14. Ehokardiografske karakteristike kod bolesnika na hemodijalizi

EHO parametri	$\bar{x}\pm SD/ n(\%)$	Min-Max
EDD (mm)	51,75±6,79	33-73
ESD (mm)	32,51±7,02	15-53
IVS (mm)	12,63±2,22	7-21
LVPW (mm)	12,22±3,94	7-18
FS LK (%)	37,51±8,37	14-60
EF LK (%)	64,09±9,34	23-85
LP (mm)	43,65±6,91	24-69
LVM (g)	263,75±82,28	57-576
LVMi (g/m ²)	146,57±41,75	37-278
RWT	0,48±0,09	0,26-0,83
E (ms)	0,78±0,24	0,35-1,41
A (ms)	1,00±0,24	0,55-1,86
E/A (ms)	0,79±0,26	0,35-1,69
Dec (ms)	259,31±97,54	89-787

* EDD end-dijastolni dijametar, ESD end-sistolni dijametar, IVS interventrikularni septum, LVPV debljina zadnjeg zida leve komore, EF LK ejectionna frakcija leve komore, FS LK frakcija skraćivanja leve komore, LP leva pretkomora, LVM masa leve komore, LVMi indeks mase leve komore, RVT relativna debljina zida.

U Tabeli 14. su prikazani ehokardiografski parametri kod bolesnika na hemodijalizi, prikazani u vidu srednjih vrednosti sa standardnim devijacijama, minimalnim i maksimalnim vrednostima.



Grafikon 4 | Distribucija različitih tipova geometrije leve komore

Distribucija geometrije leve komore je prikazana na Grafikonu 4. Utvrđeno je da najveći broj bolesnika na hemodijalizi ima koncentričnu hipertrofiju leve komore 88 (62%), potom ekscentričnu hipertrofiju 26 (18%), koncentrično remodelovanje je bilo prisutno kod 21 (15%) bolesnika, dok je samo kod 7 (5%) bolesnika registrovana normalna geometrija srca.

Nadalje su pacijenti grupisani u dve grupe: prvu grupu su činili bolesnici na hemodijaluzi sa normalnom geometrijom i koncentričnim remodelovanjem leve komore kojih je ukupno bilo 28 (19,7 %) i drugu grupu bolesnici sa hipertrofijom (koncentričnom i ekscentričnom) kojih je bilo 114 (80,3%).

Tabela 15. Sociodemografski parametri kod bolesnika sa i bez hipertrofije leve komore

Ispitivani parametri	bez hipertrofije n=28	hipertrofija n=114	p
Pol (<i>muškarci/žene</i>)	21/7	67/47	0,113
Starost (<i>godine</i>)	51,75±13,92	60,78±11,28	<0,001
Dijalizni staž (<i>meseći</i>)	93,46±85,84	70,01±76,21	0,150
HD start (<i>godine</i>)	43,96±14,84	54,94±13,06	0,001
Rezidualna diureza (<i>ml</i>)	314,04	325,84±411,16	0,371
Hipertenzija	23(82,1)	103(90,4)	0,218
Šećerna bolest	3(10,7)	18(15,8)	0,498
Pušenje	11(39,3)	39(34,2)	0,614

Grupa bolesnika sa hipertrofijom bila je homogena prema polnoj strukturi ($\chi^2=0,829$; $p=0,408$) u odnosu na grupu bolesnika bez hipertrofije. Bolesnici sa hipertrofijom bili su značajno stariji ($t=3,618$; $p<0,001$). Dužina dijaliznog staža nije bila statistički značajno različita među grupama ($Z=1,439$; $p=0,150$). Starost pri početku dijaliziranja (HD start) bila je značajno veća među osobama sa hipertrofijom leve komore ($Z=3,353$; $p=0,001$). Rezidualna diureza se nije značajno razlikovala po grupama ($Z=0,849$; $p=0,371$). Distribucija hipertenzije je bila zastupljenija među bolesnicima sa hipertrofijom ali bez značajne razlike ($\chi^2=1,515$; $p=0,218$). Distribucija šećerne bolesti nije se statistički značajno razlikovala ($\chi^2=0,459$; $p=0,498$). Nije bilo statistički značajne razlike u procentu pušača u ispitivanim grupama ($\chi^2=0,254$; $p=0,614$).

Tabela 16. Biohemijski parametri kod bolesnika na hemodijalizi sa i bez hipertrofije leve komore

Ispitivani parametri	bez hipertrofije n=28	hipertrofija n=114	p
Urea (mmol/L)	23,39±5,75	25,78±5,81	0,084
Kreatinin (μmol/L)	794,52±272,23	800,94±180,57	0,708
Mokraćna kiselina (μmol/L)	412,33±87,79	402,40±99,22	0,634
Holesterol (mmol/L)	4,71±1,17	4,68±1,23	0,922
HDL (mmol/L)	0,89±0,16	0,92±0,26	0,834
LDL (mmol/L)	2,75±0,89	2,75±0,89	0,879
Trigliceridi (mmol/L)	2,25±1,781	2,39±1,71	0,465
Glukoza (mmol/L)	5,21±1,28	6,05±2,82	0,135
Ukupni protein (g/L)	69,10±3,55	66,64±7,42	0,026
Albumini (g/L)	38,29±2,83	37,90±2,65	0,487
Broj leukocita $\times 10^9/L$	7,21±1,95	6,73±1,93	0,241
Broj eritrocita $\times 10^{12}/L$	3,37±0,39	3,42±0,52	0,624
Hemoglobin (g/L)	105,89±12,58	106,02±15,85	0,969
Hematokrit (%)	31,33±3,65	31,73±3,96	0,630
Broj trombocita $\times 10^9/L$	185,25±67,97	178,78±61,72	0,627
Gvožđe (μmol/L)	15,93±19,62	12,44±10,26	0,609
UIBC (μmol/L)	26,18±4,80	25,56±8,17	0,377
TIBC (μmol/L)	38,53±6,24	37,18±7,04	0,712
Saturacija (%)	41,04±53,58	34,04±27,03	0,944
AST (U/L)	13,82±7,25	14,62±6,87	0,308
ALT (U/L)	21,32±22,86	19,18±10,58	0,486
GGT (U/L)	43,44±61,35	34,91±28,87	0,882
Kalijum (mmol/L)	5,57±0,69	5,93±0,83	0,036
Natrijum (mmol/L)	138,16±2,17	138,25±2,33	0,802
CRP (mg/L)	10,55±19,45	5,83±8,06	0,472

Vrednosti ukupnih proteina su bile značajno niže u grupi bolesnika sa hipertrofijom leve komore ($Z=2,221$; $p=0,026$). Vrednosti albumina su bile niže u grupi bolesnika sa hipertrofijom sli bez značajne razlike ($Z=0,659$; $p=0,487$). Nivo kalijuma je bio značajno veći među bolesnicima sa hipertrofijom srca ($t=2,117$; $p<0,001$). Nivo natrijuma je bio ujednačen po grupama ($Z=0,251$; $p=0,802$). Vrednost CRPa nije pokazala značajnu razliku u grupama ($p=0,472$). Između ostalih ispitivanih parametara nije bilo značajne razlike.

Tabela 17. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika na hemodijalizi sa i bez hipertrofije leve komore srca

Ispitivani parametri	bez hipertrofije n=28	hipertrofija n=114	p
Fosfor (mmol/L)	1,65±0,33	1,58±0,49	0,187
Kalcijum (mmol/L)	2,25±0,18	2,25±0,27	0,424
Ca x P	3,72±0,79	3,51±1,17	0,167
Ca ALB korigovni (mmol/L)	2,31±0,28	2,35±0,44	0,610
PTH (pg/mL)	439,88±786,97	252,57±316,59	0,794
Alkalna fosfataza (U/L)	103,46±124,02	75,80±36,28	0,537

Parametri mineralno koštanog metabolizma nisu se značajnije razlikovali među bolesnicima na dijalizi koji su imali hipertrofiju leve komore i bolesnika bez hipertrofije: alkalna fosfataza (p=0,537), fosfor (p=0,187), kalcijum (p=0,424), proizvod kalcijuma i fosfora (Ca x P) (p=0,167), Ca ALB korigovni (p=0,610) i PTH (p=0,794).

Tabela 18. Novi parametri mineralno koštanog metabolizma kod bolesnika na hemodijalizi sa i bez hipertrofije leve komore srca

Ispitivani parametri	bez hipertrofije n=28	hipertrofija n=114	p
<i>Klotho</i> protein (pg/mL)	356,32±484,46	423,13±894,65	0,891
FGF23 (pg/mL)	3,20±1,99	3,92±3,28	0,400
Vitamin D (ng/mL)	30,18±13,61	27,68±11,99	0,292

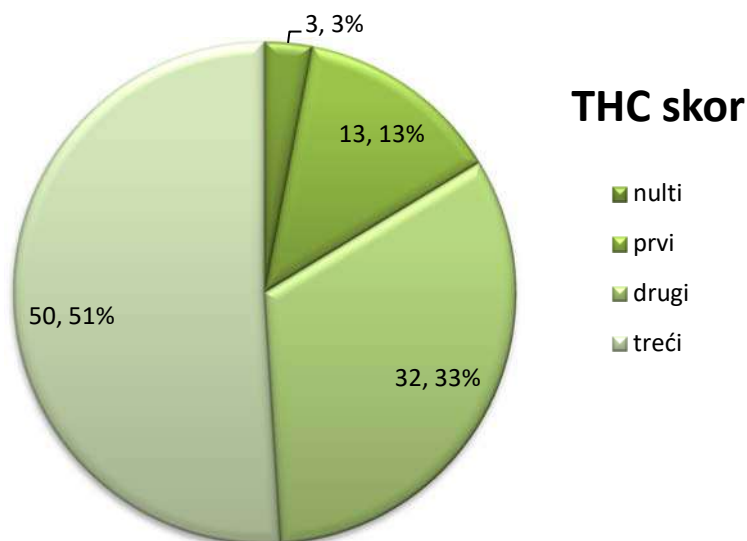
U Tabeli 18. su prikazani novi parametri mineralno koštanog metabolizma upoređivani između grupe bolesnika koja je razvila hipertrofiju leve komore i bolesnika bez hipertrofije. Nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajnu razliku između dve grupe bolesnika: *Klotho* protein (Z=0,137; p=0,891), FGF23 (Z=0,842; p=0,400) i vitamin D (Z=1,054; p=0,292).

5.4.1. Morfologija leve komore kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na genotipove i alele *Klotho* genskih polimorfizama

Tabela 19. Distribucija genotipove i alele *Klotho* G-395A i *Klotho* C1818T polomorfizma kod bolesnika sa i bez hipertrofijom leve komore

		Bez hipertrofije n=28	Hipertrofija n=114	p
SNP <i>Klotho</i> G-395A	A alel	12(42,9)	33(28,9)	0,156
	G alel	16(57,1)	81(71,7)	
SNP <i>Klotho</i> C1818T	C alel	13(46,4)	40(35,1)	0,266
	T alel	15(53,6)	74(64,9)	

Upoređujući distribuciju hipertrofije leve komore u odnosu na polimorfizme *Klotho* gena nije utvrđena statistički značajna razlika ni u polimorfizmu SNP *Klotho* G-395A ($\chi^2=2,009$; $p=0,156$) kao ni u polimorfizmu SNP *Klotho* C1818T ($\chi^2=1,236$; $p=0,266$)



Grafikon 5 | Distribucija ukupnog kalcijumskog skora (THCs)

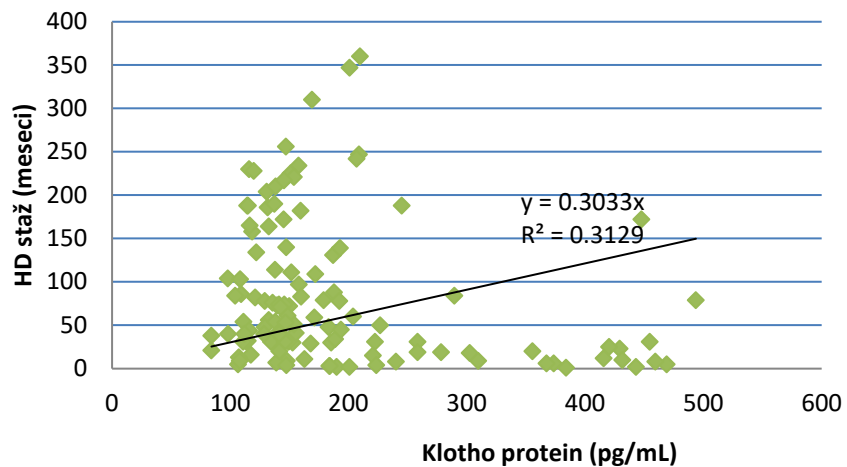
Na grafikonu je prikazana distribucija bolesnika na hemodijalizi u odnosu na stadijum THCs koji je određivan kod 98 bolesnika. Najveći broj bolesnika je imao treći stadijum THCs 50(51%), potom drugi stadijum 32 (33%), pa prvi 13 (13%) i najmanji broj bolesnika nulti stadijum, njih 3 (3%).

5.5. Korelacija i regresija novih parametara mineralno koštanog metabolizma

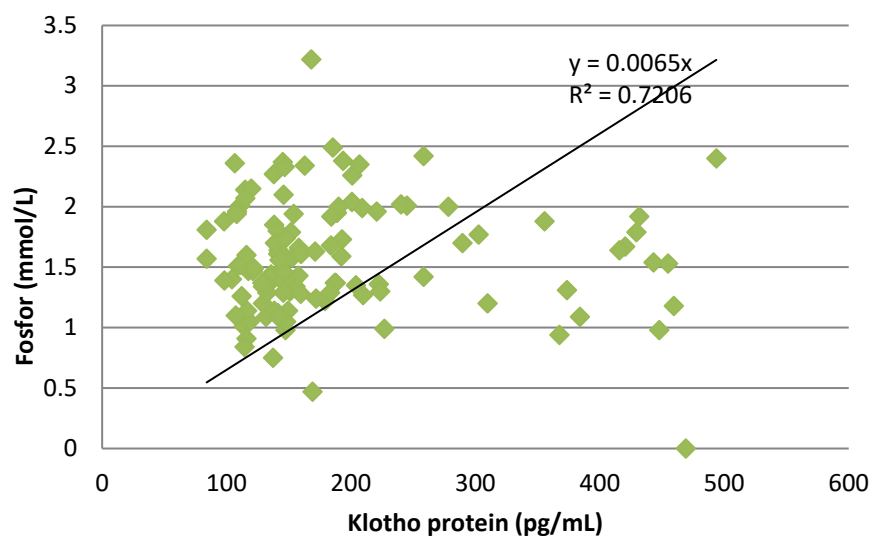
Tabela 20. Korelacioni koeficijent između *Klotho* proteina i kliničko biokemijskih parametara

Ispitivani parametri	r	p	Ispitivani parametri	r	p
Pol (muškarci/žene)	-0,146	0,111	Broj eritrocita	-0,013	0,891
Starost	-0,146	0,111	Hematokrit	-0,116	0,208
HD start (godine)	0,081	0,381	Broj trombocita	-0,011	0,908
HD staž (meseći)	-0,311	0,001	Gvožđe	0,012	0,898
Rezidualna diureza	0,109	0,235	UIBC	-0,014	0,882
Hipertenzija	-0,019	0,839	TIBC	0,031	0,735
Šećerna bolest	-0,024	0,793	Sat (%)	0,030	0,774
Pušenje	-0,063	0,492	AST	-0,139	0,130
Urea	-0,029	0,750	ALT	-0,074	0,423
Kreatinin	-0,034	0,716	GGT	-0,130	0,156
Mokraćna kiselina	0,105	0,262	Kalijum	-0,048	0,603
Holesterol	-0,110	0,235	Natrijum	-0,044	0,631
HDL	0,001	0,995	CRP	-0,074	0,426
LDL	-0,076	0,421	Alkalna fosfataza	-0,021	0,820
Trigliceridi	-0,089	0,337	Fosfor	0,197	0,032
Glukoza	-0,009	0,926	Kalcijum	-0,141	0,124
Ukupni proteini	-0,144	0,118	Ca x P	-0,114	0,213
Albumini	-0,004	0,962	Ca ALB korigovni	-0,139	0,131
Broj leukocita	-0,004	0,965	PTH	0,082	0,373

U Tabeli 20. su prikazne vrednosti koeficijenta korelacije između *Klotho* proteina i kliničko biokemijskih parametara. Statistički značajna negativna međuzavisnost *Klotho* proteina je utvrđena sa hemodijaliznim stažom ($r=-0,311$; $p=0,001$), nivo *Klotho* proteina se značajno smanjuje sa svakom godinom dijaliznog staža (Grafikon 6). Vrednosti fosfora su u značajnoj pozitivnoj korelaciji u odnosu na nivo *Klotho* proteina ($r=-0,197$; $p=0,032$) (Grafikon 7).



Grafikon 6 | Korelaciona analiza *Klotho* proteina i dijaliznog staža

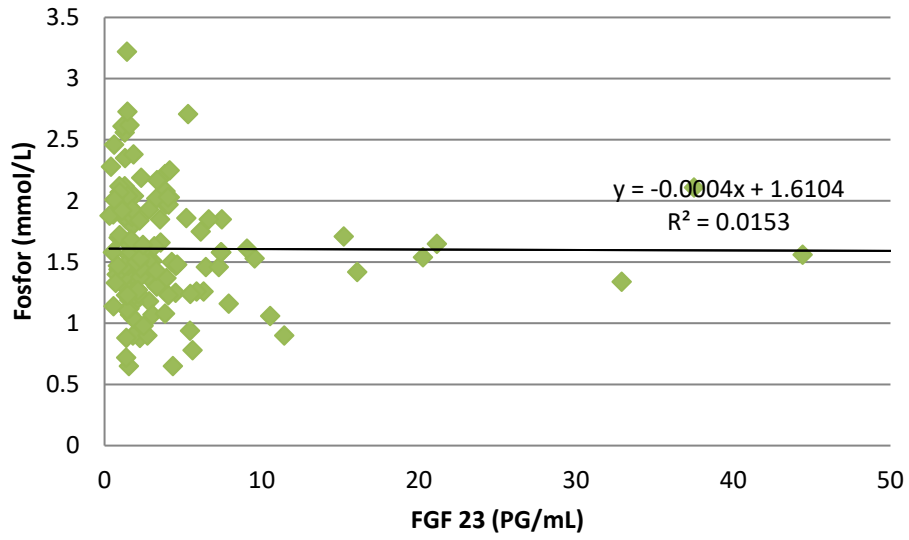


Grafikon 7 | Korelaciona analiza *Klotho* proteina i fosfora

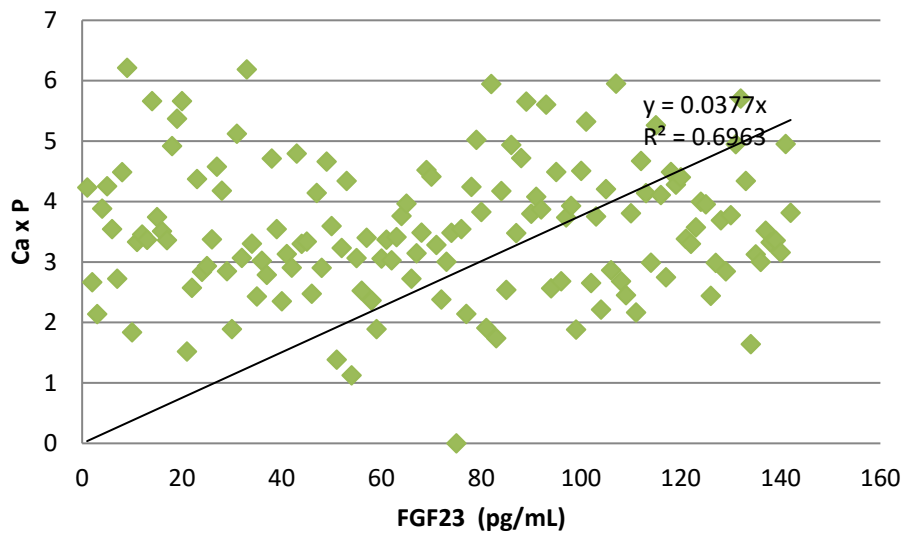
Tabela 21. Korelacioni koeficijent između FGF23 i kliničko biokemijskih parametara

Ispitivani parametri	r	p	Ispitivani parametri	r	p
Pol (muškarci/žene)	0,198	0,019	Broj eritrocita	0,131	0,123
Starost	0,198	0,119	Hematokrit	-0,035	0,681
HD start (godine)	0,154	0,070	Broj trombocita	-0,078	0,362
HD staž (meseći)	-0,152	0,073	Gvožđe	-0,028	0,746
Rezidualna diureza	-0,152	0,073	UIBC	-0,046	0,593
Hipertenzija	0,018	0,837	TIBC	-0,062	0,471
Šećerna bolest	0,130	0,126	Sat (%)	0,014	0,868
Pušenje	0,049	0,536	AST	0,183	0,031
Urea	-0,023	0,786	ALT	-0,044	0,607
Kreatinin	0,004	0,962	GGT	-0,020	0,812
Mokraćna kiselina	0,003	0,973	Kalijum	0,079	0,352
Holesterol	-0,108	0,204	Natrijum	-0,042	0,618
HDL	-0,070	0,421	CRP	-0,042	0,622
LDL	-0,179	0,040	Alkalna fosfataza	0,094	0,271
Trigliceridi	-0,048	0,571	Fosfor	-0,222	0,009
Glukoza	0,008	0,922	Kalcijum	0,022	0,795
Ukupni proteini	-0,012	0,890	Ca x P	-0,219	0,009
Albumini	-0,095	0,264	Ca ALB korigovni	0,054	0,528
Broj leukocita	-0,230	0,006	PTH	0,080	0,350

Korelaciona analiza između FGF23 i kliničko biokemijskih parametara prikazana je u Tabeli 21. Statistički značajna međuzavisnost FGF23 je utvrđena sa polom ($r=0,198$; $p=0,019$), nivo FGF23 je značajno viši među ženama. Vrednosti LDL su u značajnoj negativnoj korelaciji u odnosu na nivo FGF23 ($r=-0,179$; $p=0,040$). Vrednosti leukocita značajno opadaju sa porastom nivoa FGF23 ($r=-0,230$; $p=0,006$). Vrednosti ASTa značajno rastu sa porastom vrednosti FGF23 ($r=0,183$; $p=0,031$). Porastom vrednosti FGF23 značajno opadaju vrednosti fosfora ($r=-0,222$; $p=0,009$) (Grafikon 8), kao i vrednosti Ca x P ($r=-0,219$; $p=0,009$) (Grafikon 9).



Grafikon 8 | Korelaciona analiza FGF23 i fosfora

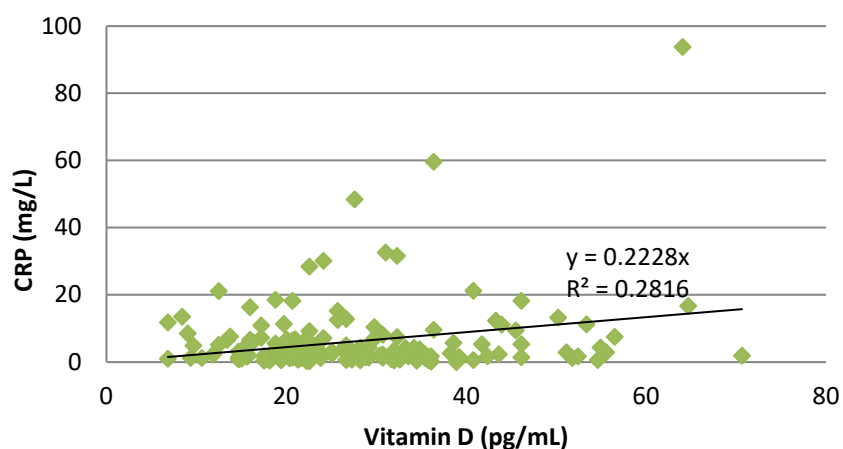


Grafikon 9 | Korelaciona analiza FGF23 i Ca x P

Tabela 22. Korelacioni koeficijent između vitamina D i kliničko biohemijskih parametara

Ispitivani parametri	r	p	Ispitivani parametri	r	p
Pol (muškarci/žene)	-0,196	0,019	Broj eritrocita	-0,028	0,740
Starost	-0,047	0,576	Hematokrit	-0,010	0,903
HD start (godine)	-0,028	0,745	Broj trombocita	0,126	0,136
HD staž (meseći)	-0,030	0,722	Gvožđe	-0,059	0,485
Rezidualna diureza	0,075	0,377	UIBC	0,014	0,864
Hipertenzija	0,041	0,624	TIBC	0,003	0,971
Šećerna bolest	0,152	0,071	Sat (%)	-0,057	0,503
Pušenje	-0,014	0,868	AST	0,162	0,055
Urea	0,077	0,362	ALT	-0,032	0,706
Kreatinin	0,066	0,434	GGT	-0,008	0,922
Mokraćna kiselina	-0,025	0,769	Kalijum	0,141	0,095
Holesterol	0,012	0,886	Natrijum	-0,034	0,690
HDL	0,112	0,197	CRP	0,183	0,030
LDL	-0,115	0,188	Alkalna fosfataza	-0,041	0,625
Trigliceridi	0,062	0,464	Fosfor	0,131	0,123
Glukoza	-0,097	0,252	Kalcijum	0,075	0,377
Ukupni proteini	-0,076	0,368	Ca x P	0,155	0,066
Albumini	0,053	0,534	Ca ALB korigovni	0,060	0,476
Broj leukocita	0,071	0,401	PTH	-0,009	0,920

Korelaciona analiza između vitamina D i kliničko biohemijskih parametara prikazana je u Tabeli 22. Utvrđeno je da je nivo vitamina D veći kod muškaraca ($r=-0,196$; $p=0,019$). Nivo CRPa je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom vitamina D ($r=0,181$; $p=0,030$).

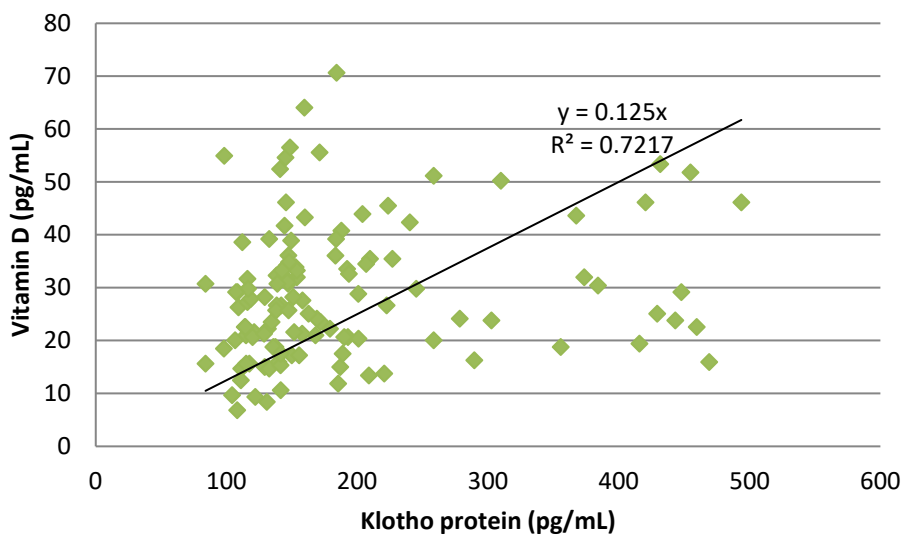


Grafikon 10 | Korelaciona analiza vitamina D i CRP

Tabela 23. Korelacioni matriks novih parametara mineralno koštanog metabolizma

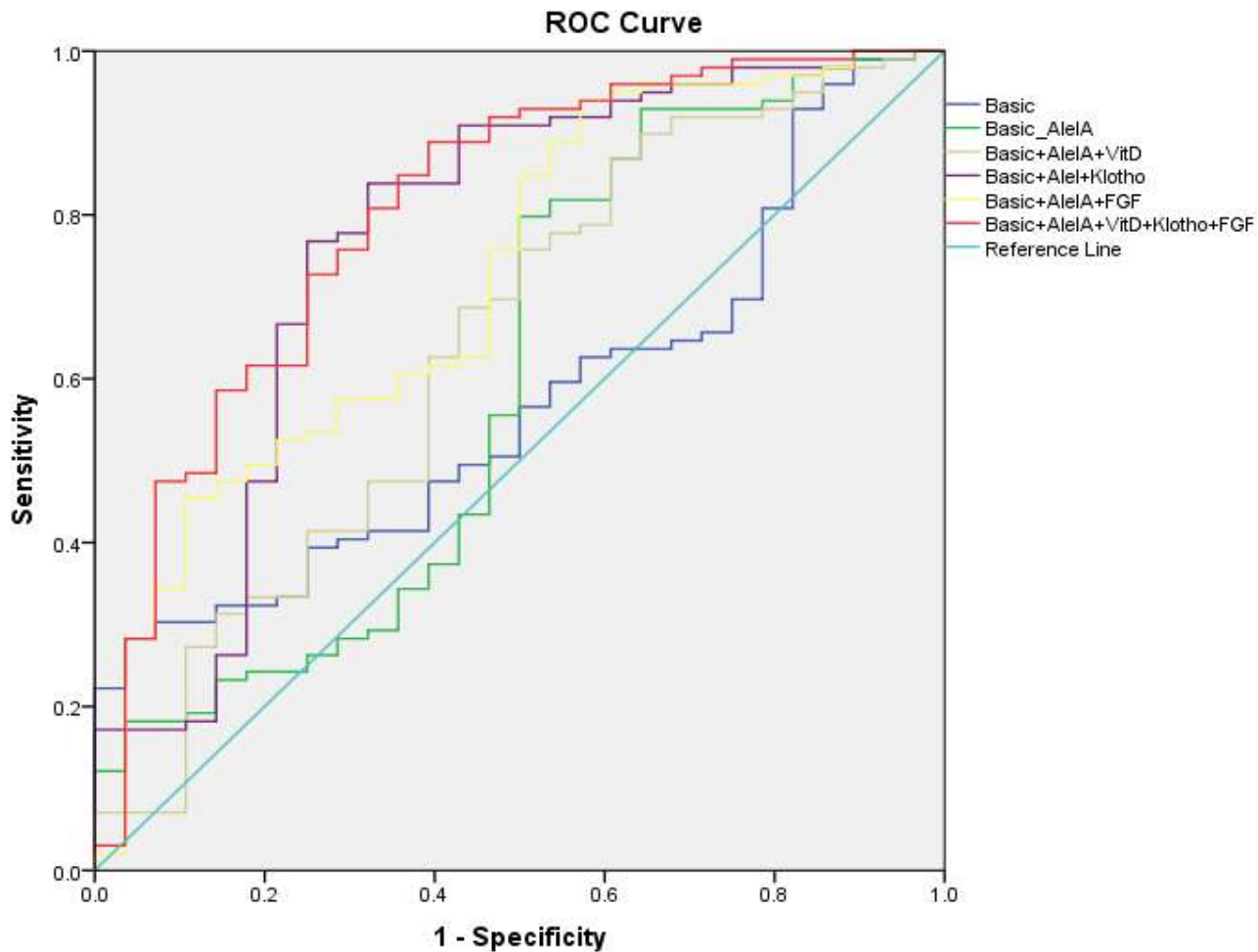
	<i>Klotho</i> protein	FGF23	Vitamin D
<i>Klotho</i> protein	-	-0,101 0,243	0,263 0,002
FGF23		-	-0,025 0,772
Vitamin D			-

Međusobna korelacija između novih parametara mineralno-koštanog metabolizma je data u Tabeli 23. Statistički značajna pozitivna povezanost je utvrđena između *Klotho* proteina i vitamina D ($r=0,263$; $p=0,002$) (Grafikon 11).



Grafikon 11 | Korelaciona analiza *Klotho* proteina i vitamina D

5.6. Prediktivna vrednost parametara mineralno-koštanog metabolizma za nastanak hipertrofije leve komore



Grafikon 12 | ROC kriva različitih kombinacija klasičnih i novih parametara mineralno-koštanog metabolizma i SNP *Klotho* G-395A za nastanak hipertrofije leve komore

Osnovni model za nastanak hipertrofije leve komore kod bolesnika na hemodijalizi uključivao je osnovne parametra mineralno-koštanog metabolizma (Ca, P, ALP i PTH). Osnovnom modelu smo dodali nove parametre mineralno-koštanog metabolizma (vitamin D, *Klotho* protein i FGF23) i A alel SNP *Klotho* G-395A, kako bismo procenili njihov doprinos predviđanju rizika. Koristeći Delong-ovu metodu, uporedili smo svaki model sa osnovnim modelom, odnosno pratili smo porast površine pod krivom (AUC), ali i NRI i IDI parametre koji su procenjivali performanse prediktivnih modela. (Grafikon 12. i Tabele 24). Dodavanjem FGF23 i SNP *Klotho* G-395A dobijeno je poboljšanje modela, AUC od 0,569 na 0,724 ($p=0,008$) i poboljšana

reklasifikacija pacijenata za 54,8% (95% CI 14,1-95,4%). Dodavanjem *Klotho* i SNP *Klotho* G-395A dobijena je bolja prediktivna moć, AUC od 0,569 na 0,766 ($p=0,008$) uz poboljšanje neto reklasifikacije na 60,5% (95% CI 20,8-100,2%). Najbolja predikcija za nastanak HLK kod naših bolesnika je postignuta dodavanjem sva tri nova parametra mineralno-koštanog metabolizma i SNP *Klotho* G-395A; AUC je pokazala značajno poboljšanje sa 0,569 na 0,806 ($p < 0,001$) i poboljšanje neto reklasifikacije za 82,1% (95% CI 42,9-121,3%) (Tabela 24).

Table 24. Performanse prediktivnih modela za nastanak hipertrofije leve komore kod bolesnika na hemodijalizi

Hipertrofija leve komore		AUC	95%CI	Co	p-value*	NRI	95%CI	p	IDI	95%CI	p
Modeli	Varijante										
1	Basic (Ca+P+AF+PTH)	0.569	0.459-0.679	-	-		-	-		-	-
2	Basic+ AlleleA	0.601	0.469-0.733	1 vs. 2	0.566	0.343	-0.068-0.753	0.102	0.025	-0.003-0.053	0.081
3	Basic+AlleleA+VitD	0.640	0.517-0.764	1 vs. 3	0.260	0.344	-0.071-0.759	0.104	0.027	-0.002-0.056	0.069
4	Basic+AlleleA+FGF23	0.724	0.615-0.833	1 vs. 5	0.008	0.548	0.141-0.954	0.008	0.118	0.059-0.177	<0.001
5	Basic+AlleleA+ <i>Klotho</i>	0.766	0.652-0.880	1 vs. 4	0.005	0.605	0.208-1.002	0.003	0.143	0.053-0.233	0.002
6	Basic+AlleleA+VitD+ <i>Klotho</i> +FGF23	0.806	0.708-0.903	1 vs. 6	<0.001	0.821	0.429-1.213	<0.001	0.220	0.112-0.328	<0.001

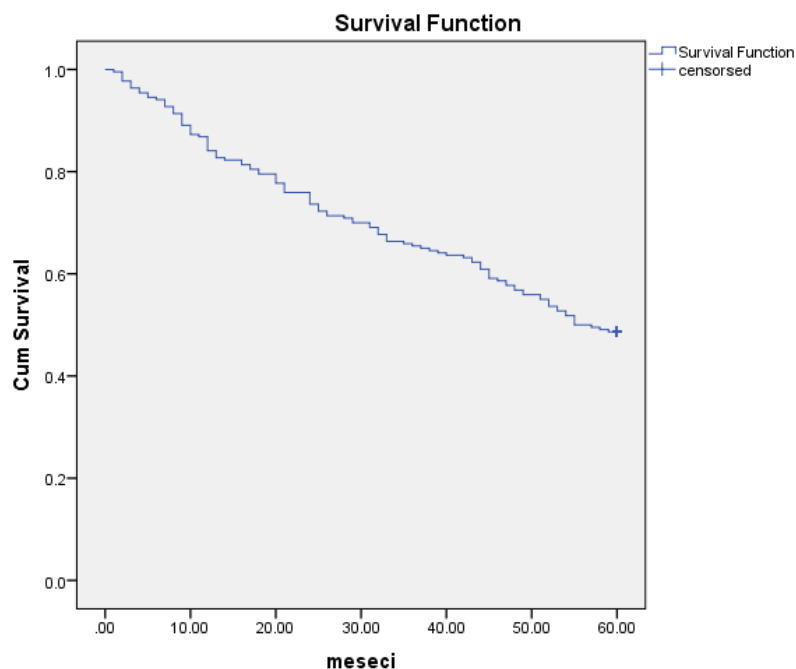
* De Long test

5.7. Analiza preživljavanja

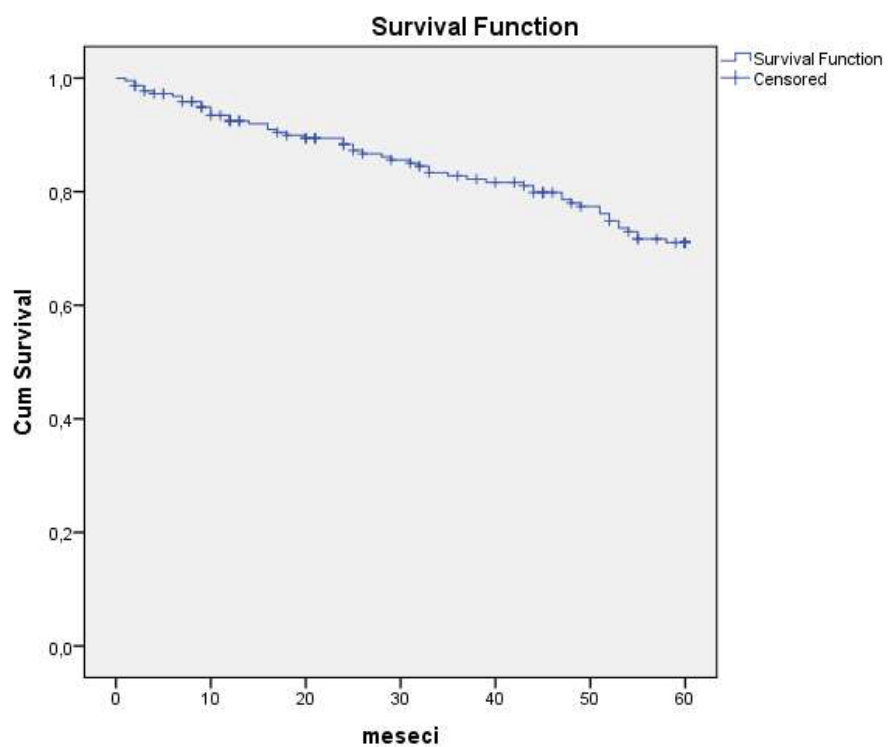
Pacijenti na hemodijalizi su praćeni 5 godina (60 meseci) kada su beleženi tačan datum i uzrok smrti na osnovu kojih je urađena analiza preživljavanja. Trogodišnje preživljavanje svih pacijenata je bilo 65,5%, četvorogodišnje preživljavanje pacijenata je bilo 57,1%, a petogodišnje preživljavanje je 47,9%. U petogodišnjem periodu je umrlo 74 pacijenata (52,1%) na hemodijalizi. Od kardiovaskularnih bolesti umrlo je 35 pacijenata, što predstavlja 47,3% od ukupnog broja umrlih pacijenata, a 24,6% iz cele ispitivane populacije.

Tabela 25. Preživljavanje bolesnika tokom ispitivanog perioda

	Preživeli			opšti mortalitet	KV mortalitet
	n (%)	$\bar{x} \pm SG$	95%CI	n (%)	n (% od preminulih)
3 godine	93 (65,5)	29,18±0,74	27,72-30,64	49 (34,5)	22 (44,9)
4 godine	81 (57,1)	36,66±1,08	34,54-38,78	61 (42,9)	27 (44,3)
5 godina	68 (47,9)	42,95±1,40	40,20-45,69	74 (52,1)	35 (47,3)



Grafikon 13 | Kaplan-Maier-ova kriva ukupnog preživljavanja u petogodišnjem periodu



Grafikon 14 | Kaplan-Maier-ova kriva preživljavanja u odnosu na kardiovaskulane uzroke smrti u petogodišnjem periodu

Tabela 26. Klinički i biohemijski parametri ispitanika prema smrtnom ishodu

Ispitivani parametri	preživeli n=68	umrli n=74	p
Pol (<i>muškarci/žene</i>)	45/24	42/31	0,348
Starost (<i>godine</i>)	57,92±12,76	66,70±10,88	<0,001
Urea (<i>mmol/L</i>)	25,04±5,53	23,78±5,94	0,109
Kreatinin (<i>μmol/L</i>)	775,39±130,56	806,70±210,04	0,001
Mokraćna kiselina (<i>μmol/L</i>)	393,42±93,56	399,50±90,90	0,636
Holesterol (<i>mmol/L</i>)	4,77±1,27	4,49±1,23	0,103
HDL (<i>mmol/L</i>)	0,94±0,24	0,90±0,24	0,273
LDL (<i>mmol/L</i>)	2,78±0,94	2,75±0,89	0,718
Trigliceridi (<i>mmol/L</i>)	2,32±1,45	2,06±1,61	0,081
Glukoza (<i>mmol/L</i>)	6,55±7,32	6,14±2,17	0,048
Ukupni protein (<i>g/L</i>)	67,34±7,40	66,86±4,81	0,093
Albumini (<i>g/L</i>)	38,07±2,56	36,84±3,48	0,029
CRP (<i>mg/L</i>)	5,28±8,50	10,86±16,29	<0,001
Broj leukocita $\times 10^9/L$	6,56±1,88	7,27±2,27	0,012
Broj eritrocita $\times 10^{12}/L$	3,39±0,48	3,38±0,50	0,476
Hemoglobin (<i>g/L</i>)	105,01±16,41	104,82±13,89	0,589
Hematokrit (%)	33,34±4,14	31,19±3,91	0,355
Broj trombocita $\times 10^9/L$	178,35±57,51	189,36±71,81	0,094
Gvožđe (<i>μmol/L</i>)	13,32±14,11	11,94±5,73	0,672
AST (<i>U/L</i>)	14,40±9,39	14,24±5,89	0,302
ALT (<i>U/L</i>)	12,05±9,69	12,53±8,28	0,539
GGT (<i>U/L</i>)	32,78±35,16	47,10±68,70	0,016

U tabeli 26. prikazana su poređenja kliničko biohemijskih parametara između preminulih i preživelih bolesnika na hemodijalizi u petogodišnjem periodu. Nije utvrđena značajna povezanost između pola i ishoda praćenja bolesnika ($\chi^2=0.882$; $p=0,348$). Utvrđeno je da su bolesnici koji su preminuli bili statistički značajno stariji u poređenju sa preživelim bolesnicima ($t=2,848$; $p<0,001$). Vrednosti kreatinina su bile značajno više među umrlim bolesnicima ($t=2,144$; $p=0,001$). Nivo glukoze je bio niži kod preminulih bolesnika ($Z=1.978$; $p=0,048$). Utvrđeno je da je nivo albumina ($Z=2,179$; $p=0,010$) bio značajno niži kod preminulih ispitanika. CRP je bio značajno viši među bolesnicima koji su preminuli tokom petogodišnjeg perioda ($Z=4.447$; $p<0,001$). Takođe je među preminulima i nivo GGta bio statistički značajno viši u poređenju sa preživelim bolesnicima ($Z=2,407$; $p=0,004$). Ostali ispitivani parametri nisu pokazali statistički značajnu razliku.

Tabela 27. Standardni parametri mineralno koštanog metabolizma ispitanika prema smrtnom ishodu

Ispitivani parametri	preživeli n=68	umrli n=74	p
Fosfor (mmol/L)	2,54±0,45	1,56±0,46	0,908
Kalcijum (mmol/L)	2,19±0,22	2,24±0,25	0,453
Ca x P	3,35±1,12	3,47±1,13	0,829
Ca ALB korigovni (mmol/L)	2,22±0,37	2,31±0,26	0,196
PTH (pg/mL)	243,42±280,83	321,42±516,44	0,764
Alkalna fosfataza (U/L)	76,78±47,14	93,51±73,75	0,006

Parametri mineralno koštanog metabolizma u odnosu na ishod praćenja tokom petogodišnjeg perioda su prikazani su u Tabeli 27. Jedini parameter koji se statistički značajno razlikovao među ispitivanim grupama je bila alkalna fosfataza koja je bila znatno viša kod umrlih bolesnika ($Z=2,770$; $p=0,006$).

Tabela 28. Novi parametri mineralno koštanog metabolizma ispitanika prema smrtnom ishodu

Ispitivani parametri	preživeli n=68	umrli n=74	p
Klotho protein (pg/mL)	445,93±602,88	209,81±277,39	<0,001
FGF23 (pg/mL)	3,69±3,08	3,61±2,44	0,533
Vitamin D (ng/mL)	29,33±12,75	23,27±11,81	<0,001

Od novih parametara koštano mineralnog metabolizma utvrđeno je da je nivo *Klotho* proteina bio značajno niži kod preminulih bolesnika u poređenju sa preživelim (Z=4,008; $p<0,001$). Nije bilo značajne razlike u nivou FGF23 ($p=0,533$). Vitamin D je kod preminulih bolesnika bio značajno niži u poređenju sa preživelim nakon petogodišnjeg praćenja ($Z=3,718$; $p<0,001$).

Tabela 29. Distribucija genotipova ispitivanih *Klotho* polimorfizama u odnosu na smrtni ishod

Ispitivani polimorfuzmi		umrli n=74	p
G-395A	A alel (AA+GA)	31(43,0)	0,637
	G alel (GG)	42(57,0)	
C1818T	C alel (CC)	27(37,2)	0,255
	T alel (CT+TT)	46(62,8)	

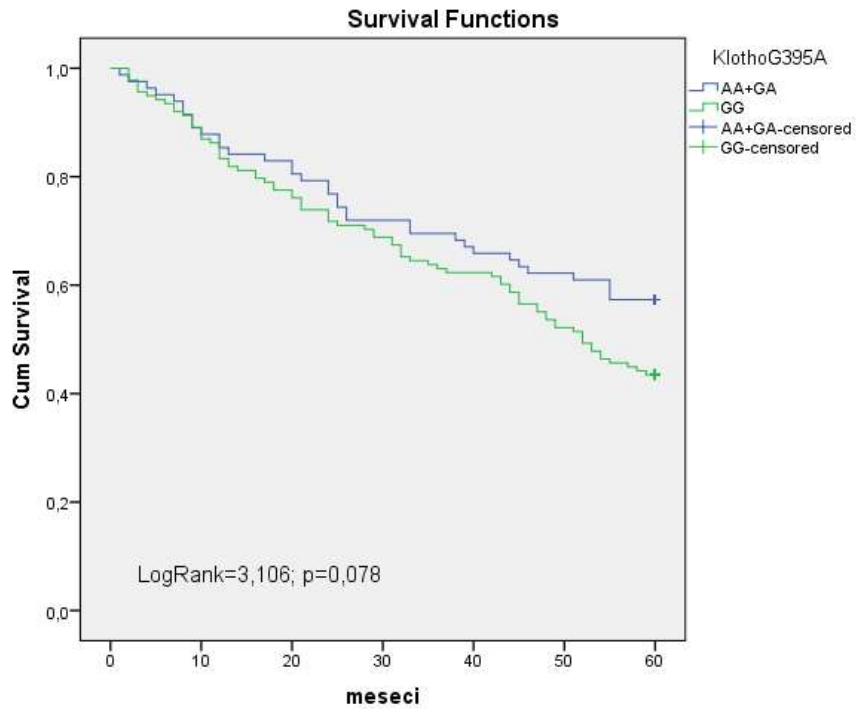
Nije bilo statistički značajne razlike između genotipova *Klotho* G395A polimorfizma u odnosu na smrtni ishod kod bolesnika na hemodijalizi ($\chi^2=0,223$; $p=0,637$) (Tabela 29). Takođe nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova *Klotho* 1818T prema smrtnom ishodu kod bolesnika na hemodijalizi ($\chi^2=1,294$; $p=0,255$).

Tabela 30. Preživljavanje u odnosu na distribuciju genotipova ispitivanih *Klotho* polimorfizama

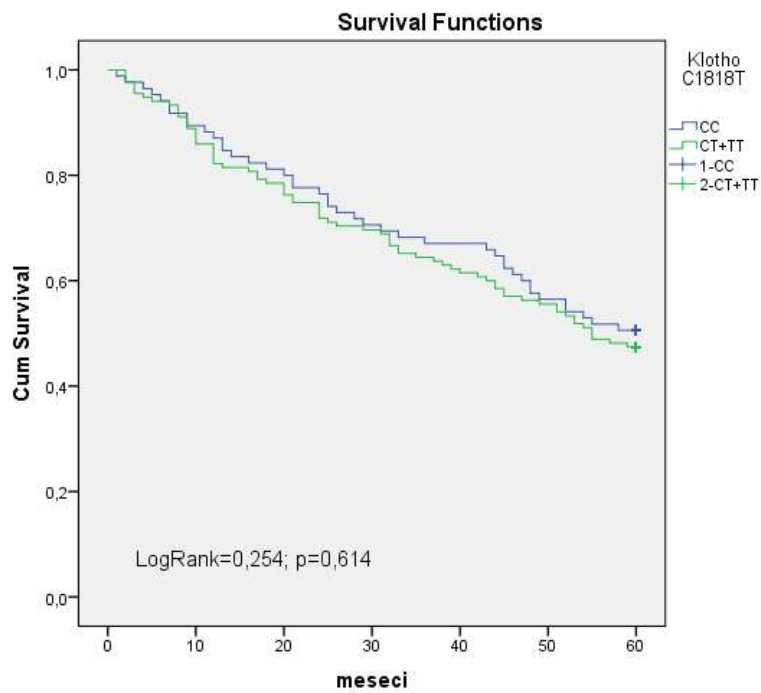
Ispitivani polimorfuzmi		\bar{x}	SG	95% CI	Log Rank	p
G-395A	A alel (AA+GA)	44,90	2,27	40,46-49,35	3,106	0,078
	G alel (GG)	41,79	1,77	38,31-45,27		
C1818T	C alel (CC)	43,91	2,21	39,57-48,24	0,254	0,614
	T alel (CT+TT)	42,35	1,81	38,80-45,89		

Prosečno petogodišnje preživljanje nosioca A alelea je bilo $44,90 \pm 2,27$ meseci sa 95%CI (40,46-49,35 meseci), dok je kod nosioca G alela preživljavanje iznosilo $41,79 \pm 1,77$ meseci sa 95%CI (38,31-45,27 meseci). Log rank testom nije utvrđena značajna razlika u dužini preživljavanja prema distribuciji genotipova *Klotho* G395A (Logrank=3,106, $p=0,078$) (Grafikon 15).

Prosečno petogodišnje preživljanje nosioca C alelea je bilo $43,90 \pm 2,27$ meseci sa 95%CI (39,57-48,24 meseci), dok je kod nosioca T alela preživljavanje iznosilo $42,35 \pm 1,81$ meseci sa 95%CI (38,80-45,89 meseci). Log rank testom nije utvrđena statistički značajna razlika u preživljavanju u odnosu na distribuciju genotipova *Klotho* C1818T (Logrank=0,254, $p=0,614$) (Grafikon 16).



Grafikon 15 | Kaplan- Maier-ova kriva preživljavanja u odnosu na distribuciju genotipova *Klotho* G-395A polimorfizma

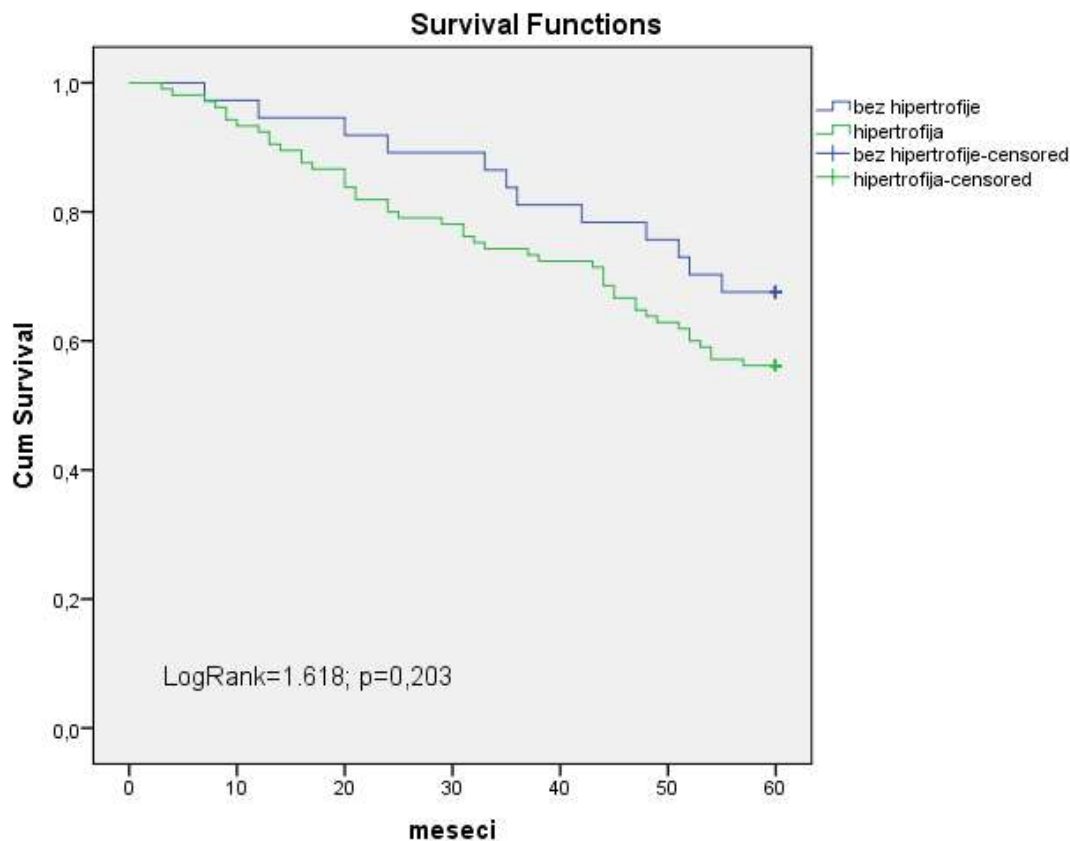


Grafikon 16 | Kaplan-Maier-ova kriva preživljavanja u odnosu na distribuciju genotipova *Klotho* C1818T polimorfizma

Tabela 31. Preživljavanje u odnosu na prisustvo hipertrofije leve komore

	umrli n=74	\bar{x}	SG	95% CI	Log Rank	p
Bez hipertrofije	12 (33,0)	51,76	2,42	47,00-56,51	1,618	0,203
Sa hipertrofijom	61 (58,0)	46,92	1,79	43,39-50,43		

Nije postojala statistički značajna razlika u distribuciji preminulih blesnika u odnosu na prisustvo hipertrofije ($\chi^2=0,721$; $p=0,396$) (Tabela 31). Log rank testom je pokazano da nema statistički značajne razlika u petogodišnjem preživljavanju bolesnika u odnosu na hipertrofiju leve komore srca (Logrank=1,618, $p=0,203$) (Grafikon 17)



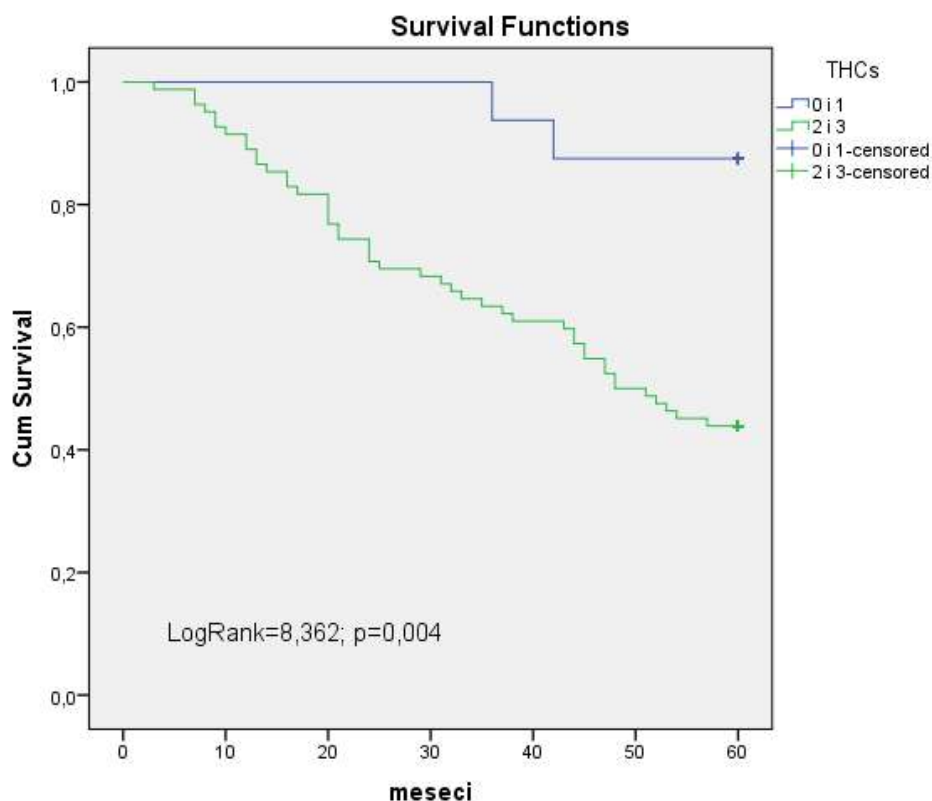
Grafikon 17 | Kaplan- Maier-ova kriva u odnosu na hipertrofiju leve komore

Tabela 32. Preživljavanje u odnosu na THC skor

Stadijumi	Umrli * n=48	\bar{x}	SG	95% CI	Log Rank	p
0 i 1	2(12,5)	57,38	1,76	53,93-60,82	8,362	0,004
2 i 3	46(56,1)	42,17	2,17	37,92-46,43		

*THCs rađen kod 98 bolesnika

Bolesnike smo podelili u dve grupe prema THC skor: prvu grupu su činili bolesnici sa nultim i prvim stadijumom, a drugu grupu sa drugim i trećim stadijumom THC skora. Prosečno preživljavanje kod bolesnika sa nultim i prvim stepenom je bilo $57,38 \pm 1,76$ meseci sa 95%CI (53,93-60,82 meseci), a kod bolesnika sa drugim i trećim stepenom $42,17 \pm 2,17$ meseca sa 95%CI (37,92-46,43meseci). Log rank testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u petogodišnjem preživljavanju između ovih grupa (Logrank=8,362, p=0,004) (Grafikon 18)



Grafikon 18 | Kaplan- Maier-ova kriva u odnosu na THC skor

Tabela 33. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost - univarijantna logistička regresiona analiza kliničkih i biohemijskih parametara

Ispitivani parametri	HR	95%CI	P
Pol (muškarci)	1,111	0,762-1,620	0,583
Starost	1,046	1,028-1,064	0,010
Urea	0,978	0,947-1,010	0,181
Kreatinin	0,999	0,998-1,000	0,063
Mokraćna kiselina	1,000	0,998-1,003	0,691
Holesterol	0,837	0,712-0,984	0,032
HDL	0,648	0,283-1,484	0,305
LDL	0,925	0,743-1,151	0,483
Trigliceridi	0,910	0,794-1,042	0,173
Glukoza	0,990	0,951-1,030	0,613
Ukupni protein	0,989	0,967-1,013	0,367
Albumini	0,882	0,830-0,937	<0,001
CRP	1,020	1,009-1,031	<0,001
Broj leukocita	1,134	1,0036-1,242	0,007
Broj eritrocita	0,957	0,801-1,145	0,634
Hemoglobin	1,000	0,988-1,012	0,983
Hematokrit	0,985	0,951-1,019	0,380
Broj trombocita	1,002	0,999-1,005	0,214
Gvožđe	0,990	0,951-1,030	0,613
AST	0,999	0,993-1,005	0,879
ALT	0,998	0,986-1,010	0,750

U Tabeli 33. su prikazane prediktivne vrednosti kliničkih i biohemijskih parametara u odnosu na ukupnu smrtnost pacijenata. Kao nezavisni prediktori smrtnosti su se izdvojili sledeći markeri: starost (HR=1,111, p=0,010), holesterol (HR=0,837; p=0,032), koncentracija albumina (HR 0,882, p<0,001), koncentracija CRPa (HR=1,020, p<0,001) i broj leukocita (HR=1,134, p=0,007).

Tabela 34. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost - univarijantna logistička regresiona analiza standardnih parametara mineralno-koštanog metabolizma

Ispitivani parametri	HR	95%CI	P
Fosfor	0,968	0,859-1,090	0,586
Kalcijum	1,449	0,695-3,018	0,322
Ca x P	0,989	0,956-1,023	0,531
Ca ALB korigovni	2,230	1,196-4,160	0,012
PTH	1,000	1,000-1,001	0,141
Alkalna fosfataza	1,003	1,001-1,005	0,014

U tabeli 34. su prikazane prediktivne vrednosti standardnih parametara mineralno-koštanog metabolizma u odnosu na ukupnu smrtnost pacijenata. Kao nezavisni prediktor smrtnosti su se pokazale vrednosti alkalne fosfataze (HR=1,003, p=0,014) i Ca korigovanog za albumin (HR=2,230, p=0,012).

Tabela 35. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost - univarijantna logistička regresiona analiza novih parametara mineralno-koštanog metabolizma

Ispitivani parametri	HR	95%CI	P
Klotho protein	0,995	0,993-0,997	<0,001
FGF23	1,161	1,046-1,289	0,005
Vitamin D	0,972	0,956-0,988	0,001

U analizi ukupne petogodišnje smrtnosti svi novi parametri mineralno-koštanog metabolizma su se pokazali kao statistički značajni prediktori: *Klotho* protein (HR=0,995; p<0,001), FGF (HR=1,161, p=0,005), Vitamin D (HR=0,972, p=0,001).

Tabela 36. Coxova regresiona analiza za ukupnu smrtnost - model multivarijantne logističke regresione analize

Ispitivani parametri	HR	95%CI	p
AF	1,003	1,000-1,006	0,091
Ca ALB korigovni	2,630	0,952-7,263	0,062
Vitamin D	1,015	0,991-1,041	0,220
Klotho protein	0,993	0,989-0,997	0,001
FGF23	1,178	1,050-1,320	0,005
THCs	1,896	1,217-2,954	0,005
LP	1,013	0,962-1,068	0,620

LP – leva pretkomora

Kombinacijom statistički značajnih parametara klasičnih i novih parametara mineralno-koštanog metabolizma i ehokardiografskih parametara konstruisali smo model Coxove regresione analize na ukupnu smrtnost bolesnika na hemodijalizi. U modelu su se kao statistički značajni prediktori izdvojili sledeći faktori: *Klotho* protein (HR=0,993; p=0,001), FGF23 (HR=1,178; p=0,005) i THC (HR=1,896; p=0,005).

Tabela 37. Coxova regresiona analiza za kardiovaskularnu smrtnost - model multivarijantne logističke regresione analize

Ispitivani parametri	HR	95%CI	p
AF	1,004	1,001-1,007	0,016
Vitamin D	0,998	0,969-1,428	0,878
THCs	2,128	1,059-4,276	0,034

Kombinacijom statistički značajnih parametara klasičnih i novih parametara mineralno-koštanog metabolizma i ehokardiografskih parametara konstruisan je model Coxove regresione analize za kardiovaskularnu smrtnost bolesnika na hemodijalizi. Modelu su činili AF, Vitamin D i THC. Statističku značajnost u modelu su zadržale AF (HR=1,004; p=0,016) i THC (HR=2,128; p=0,034).

6. DISKUSIJA

Hronična bubrežna insuficijencija je sistemska bolest, od koje boluje sve veći broja bolesnika širom sveta, stoga poslednjih decenija dostiže razmere epidemije. Najčešća metoda zamene bubrežne funkcije kod bolesnika sa HBI je hemodijaliza [222]. Bolesnici na hemodijalizi imaju veliki broj komorbiditeta, ali i visoku stopu smrtnosti, najčešće kao posledica kardiovaskularnih bolesti, odnosno uremijske kardiomiopatije, ateroskleroze i vaskulopatije [205]. U etiopatogenezi kardiovaskularnih komplikacija uključeno je nekoliko faktora rizika kao što su inflamacija, oksidativni stres, endotelna disfunkcija i vaskularne kalcifikacije, ali i genetski faktori takođe mogu igrati značajnu ulogu [223].

6.1. Standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika na hemodijalizi

U našem istraživanju u grupi bolesnika na HD, analizom ispitivanih biohemijskih parametara, zabeležene su značajno više koncentracije azotnih produkata u poređenju sa kontrolnom grupom. Bolesnici na HD imaju izražen anemijski sindrom, značajno snižene vrednosti ukupnog holesterola i povišene vrednosti triglicerida, snižene vrednosti ukupnih proteina i albumina, kao i značajnu hiperkalijemiju. U skladu sa našim rezultatima je i istraživanje sprovedeno u istom hemodijaliznom centru kod 153 bolesnika, gde je analizirana prediktivna vrednost parametara malnutricije (albumini), inflamacije (CRP i serumskog amiloida) i endotelne disfunkcije (asimetričnog dimetilarginina) za mortalitet, gde su se između ostalog, hipoalbuminemija i povišene vrednosti CRPa istakle kao značajni faktori rizika [224].

Poređenjem standardnih parametara mineralno-koštanog metabolizma naše istraživanje je pokazalo da bolesnici na HD imaju značajno povišene vrednosti fosfata, PTH i alkalne fosfataze, a snižene vrednosti kalcijuma u poređenju sa ispitanicima iz kontrolne grupe. Najznačajnija razlika između ispitivanih grupa je bila hiperfosfatemija. Ovakvi podaci su u skladu sa literaturnim podacima, koji ističu da se izražena hiperfosfatemija primećuje kod uznapredovale bubrežne bolesti, što ukazuje da se homeostaza fosfata održava do 4–5 stadijuma HBI [53]. Smanjenjem broja funkcionalnih nefrona povećava se izlučivanje fosfata po nefronu, što se postiže povećanjem koncentracije FGF23, koji počinje da se povećava u ranim stadijumima HBI. Povećanje FGF23 dovodi do smanjenja 1,25-dihidroksivitamina D, koji potom povećava koncentraciju paratireoidnog hormona. Stoga se FGF23 može smatrati okidačem CKD–MBD poremećaja, u nastojanju da se eliminiše višak unetih fosfata u odnosu na preostali broj nefrona.

Zbog toga treba razmotriti restrikciju fosfata čak i kod normofosfatemičnih bolesnika sa HBI i povišenim vrednostima FGF23 kako bi se izbegle ili ublažile posledice CKD-MBD [225].

CKD-MBD nastaje kao kompenzatorni odgovor FGF23-*Klotho* sistema zbog viška unetih fosfata, koji pokreću kaskadu štetnih efekata na različite organe i sisteme [226]. Japanski istraživač *Makoto Kuro-o*, koji je otkrio *Klotho* gen, patološko stanje nastalo kao posledica viška fosfata naziva fosfatopatija. Ovo stanje se može javiti samo kod viših organizama koji imaju *Klotho* gen, i pruža nove uvide u molekularne mehanizme starenja kod ljudi, i mehanizme progresije hronične bubrežne insuficijencije [194].

Fosfaturična aktivnost FGF23 zasniva se smanjenju reapsorpcije fosfata redukcijom natrijum zavisnog transportera fosfata tipa II a/c (NaPT2a i NaPT2c) na apikalnoj membrani proksimalnih tubula [227]. Kontraregulatorna aktivnost FGF23 na 1,25-dihidroksivitamin D (kalcitriol) zasniva se na suzbijanju ekspresije α -hidroksilaze neophodne za sintezu 1,25-dihidroksivitamina D i indukcije ekspresije 24-hidroksilaze koja je odgovorna za razgradnju 1,25-dihidroksivitamina D [227]. Stoga kod miševa kod kojih nedostaje FGF23 ili *Klotho* dolazi do zadržavanje fosfata, usled poremećaja njihove urinarne ekskrecije i intoksikacija vitaminom D, usled povećane sinteze i smanjene razgradnje kalcitriola. Iz navedenog proizilazi pitanje šta je odgovorano za ubrzano starenje, zadržavanje fosfata ili intoksikacije vitaminom D, te su sprovedena istraživanja na miševima kojima nedostaje FGF23 ili *Klotho*, koji imaju fenotip sličan starenju [84, 228, 229]. Kako bi se odgovorilo na pitanje, sprovedena su istraživanja na životinjama koje su podvrgavane dijeti sa malo vitamina D, vršena je ablacija gena za vitamina D receptora ili *Cip27b1*, što je dovelo do smanjenja koncentracije fosfata u serumu, ali nije isključena mogućnost da zadržavanje fosfata ubrzava starenje. U drugim studijama miševi su podvrgavani dijeti sa manje fosfata ili je vršena ablacija gena za NaPT2a [230, 231], što je sprečilo zadržavanje fosfata i dovelo do poboljšanja tegoba koje su nastale u sklopu sindroma sličnog starenju. Ovo ukazuje da je zadržavanje fosfata, a ne intoksikacija vitaminom D, prvenstveno odgovorno za ubrzano starenje. Međutim, primećeno je da svi miševi kojima nedostaje FGF23 ili *Klotho* nemaju identičan fenotip onom koji nastaje prirodnim tokom starenja. Stoga je predloženo da se sindrom sličan starenju nazove fosfatopatija, što predstavlja stanje koje

karakteriše fenotip sličan starenju gde ograničenjem unosa fosfata dolazi do poboljšanja kliničko-biohemijskih parametara [14].

Fosfatopatija se sreće kod bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom. Ovi bolesnici imaju vaskularne kalcifikacije, hipertrofiju leve komore, povećanu smrtnost, zatim osteopeniju i sarkopeniju povezanu sa smanjenom ekspresijom *Klotho* proteina [232]. Pokazano je da progresijom HBI kod bolesnika nastaje hiperfosfatemija, dok primenom terapije za snižavanje fosfata dolazi do poboljšanja njihovih rezultata i kliničke slike [41, 233]. Činjenica da pacijenti sa HBI i miševi sa nedostatkom *Klotho* proteina dele mnogo zajedničkih karakteristika doveli su do ideje da se HBI može posmatrati kao klinički model ubrzanog starenja [234].

Visoke koncentracije ekstracelularnog fosfata su toksične za ćelije, kod vaskularnih endotelnih ćelija, ukoliko su gajene u medijumu sa visokim procentom fosfata, dolazi do apoptoze, dok vaskularne glatko-mišićne ćelije doživljavaju osteoplastnu transformaciju [145]. Verovalo se da je za nastanak kalcifikacija neophodan ulazak fosfata u ćeliju preko natrijum zavisnog fosfatnog transportera tipa III (NaPT3) [235, 236]. Međutim, nedavna studija gde su korišćene ćelije sa mutiranim / blokiranim NaPT3 transporterima je pokazala da vaskularne glatko-mišićne ćelije ipak imaju sposobnost da razviju kalcifikacije u medijumu sa visokim procentom fosfata [149, 237]. Ova zapažanja su u surotnosti sa prethodnom teorijom, da je za kalcifikaciju potreban ulazak fosfata u ćeliju.

Uobičajeni medijumi za kulturu tkiva sadrže oko 1 mM fosfata i oko 2 mM kalcijuma. Te koncentracije su slične serumskim koncentracijama kod ljudi i blizu su granice rastvorljivosti. Stoga, dodavanje fosfata medijumu može izazvati stvaranje taloga kalcijum-fosfata (CaP). CaP precipitati imaju sposobnost indukcije ćelijskog oštećenja i urođenih imunskih odgovora [144, 146, 147]. U medijumu koji sadrži serum, CaP precipitati apsorbuju serumski protein fetuin-A i sprečavaju formiranje velikih kristala. Dolazi do spontane agregacije ovih molekula fetuina A napunjenih CaP i formiranja nanočestica, koje su dispergovane u medijumu kao koloidi, označene su kao čestice kalciproteina (CPP) [238]. Iako su manje aktivni od taloga neorganskog CaP, čestice CPP takođe mogu izazvati ćelijsko oštećenje [144]. Iz ovoga proizilazi pitanje ko je odgovoran za toksičnost fosfata, rastvorljivi fosfat ili nerastvorljivi CaP?

Nekoliko studija pokazuje da je nerastvorljivi CaP osnovni „krivac“ za štetne efekte fosfata. Najpre, osteoplastna transformacija glatko-mišićnih ćelija je indukovana nerastvorljivim CaP bez povećanja koncentracije fosfata [146, 147]. Kalcifikacija glatko-mišićnih ćelija indukovana visokim procentom fosfata u medijumu je izostala nakon uklanjanja nerastvorljivog CaP iz medijuma centrifugiranjem [23]. Pošto nerastvorljivi CaP u krvi ne postoji kao talog neorganskog CaP, već kao CPP, nedavna klinička ispitivanja pokazala su da nivo CPP u serumu raste padom bubrežne funkcije, i povezan je sa povećanom arterijskom krutošću, vaskularnim kalcifikacijama i hroničnom inflamacijom nezavisno od bubrežne funkcije [153, 154]. S obzirom na sposobnost CPP da indukuje kalcifikaciju glatko-mišićnih ćelija i urođene imune odgovore *in vitro*, CPP se može smatrati patogenim činiocem ali i novom terapijskom metom fosfatopatije.

Već je pokazano da je fosfat vaskularni toksin kod bolesnika sa HBI, i da koncentraciju fosfata u serumu određuje ravnoteža između apsorpcije iz creva, razmena s kostima i izlučivanje putem bubrega. Nekoliko endokrinih faktora koordinira ove procese: vitamin D, PTH, FGF23 i *Klotho* protein. Za razliku od PTH i FGF23, koncentracije fosfata u serumu povećavaju se tek sa progresijom HBI (kada JGF padne ispod 30 ml/min/1,73 m²) [239]. Samim tim ako se HBI smatra stanjem prevremenog starenja, poremećeni metabolizam fosfata mogao bi da bude glavni pokretač [215, 240]. Iako je hiperfosfatemija u HBI povezana sa vaskularnim kalcifikacijama, endotelnom disfunkcijom, HLK, progresijom HBI i bolestima kostiju, nije jasno da li sama koncentracija fosfata ili kompenzatorni endokrini odgovor povezan sa hiperfosfatemijom dovode do štetnih ishoda [241, 242]. Kontrola hiperfosfatemije je glavni terapijski cilj kod pacijenata sa uznapredovalom HBI, prevashodno na HD. Terapija se fokusira na ograničavanju apsorpcije fosfata iz hrane u gastrointestinalnom traktu, primenom oralnih vezivača fosfata ili blokatora transporta fosfata u crevima [243]. Kliničke studije koje su ispitivale efikasnost terapijskih protokola ili kombinaciju više njih su pokazale obećavajuće rezultate što se tiče biohemijskih pokazatelja, ali nisu pokazale korist za preživljavanje [244, 245]. Visoke koncentracije fosfata u cirkulaciji, čak i unutar normalnih opsega, u opštoj populaciji su povezane sa povećanim rizikom za razvoj HBI, kardiovaskularnim morbiditetom i mortalitetom [246, 247]. Ovi podaci naglašavaju da bi osobe sa relativno očuvanom funkcijom bubrega takođe mogle imati koristi od ograničenja fosfata, što se može postići smanjenim unosom fosfata ishranom [248]. Ipak, studije koje istražuju povezanost između unosa fosfata ishranom i teških ishoda (opšteg ili

kardiovaskularnog mortaliteta) nisu dale jasne rezultate. Pojedine opservacione studije pokazale su pozitivnu povezanost, dok su druge pokazale čak negativnu povezanost [249, 250]. Stoga se moraju razmotriti alternativne mogućnosti, na primer, da hiperfosfatamija ukazuje na prisustvo drugog štetnog biološkog procesa ili da strategije za kontrolu hiperfosfatamije imaju dodatne, nezapažene sporedne efekte, kao što je pothranjenost, nakon ograničenja unosa proteinskih namirnica bogatih fosfatima ili porast kalcijuma, usled upotrebe kalcijumskih vezivača fosfata [251, 252].

Čekajući dodatne dokaze iz prospektivnih studija, bolesnicima treba savetovati ograničenje konzumiranja anorganskog fosfata, a ne organskog fosfata, koji se pretežno nalazi u visoko proteinskim namirnicama. Ovaj pristup može sprečiti neželjene efekte kao što je pothranjenost. Unos anorganskog fosfata znatno se povećao u poslednjoj deceniji zbog njegove nerestriktivne upotrebe kao aditiva u hrani za pojačavanje ukusa i kao konzervansa. U zemljama sa visokim prihodima ovi aditivi za hranu mogu da dovedu do dnevnog unosa od 300–1000 mg [253]. Bolesnici sa niskim socioekonomskim statusom posebno su u opasnosti od prekomernog unosa fosfata, zbog konzumiranja velike količine jeftine hrane, bezalkoholnih pića i prerađevina obogaćenih fosfatima [254]. Visok unos fosfata ishranom ne mora nužno rezultirati visokim koncentracijama fosfata u serumu. Ipak konzumiranje neorganskog fosfata može izazvati prolaznu postprandijalnu hiperfosfatemiju zbog velike biorasploživosti. Analogno bolesnicima sa hipervolemijom ili hipertenzijom, koji imaju najviše koristi od smanjenja unosa soli, osobe sa blago smanjenom bubrežnom rezervom (stariji ljudi, pacijenti sa dijabetesom, početni stadijumu HBI i donori bubrega) verovatno će imati najviše koristi od ograničenja unosa fosfata. Istraživanja su pokazala da je edukacija bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne slabosti za izbegavanje hrane sa aditivima koji sadrže fosfate rezultiralo umerenim poboljšanjima hiperfosfatemije [255-258].

6.2. Novi parametri mineralno-koštanog metabolizma i varijacije u genu za *Klotho* protein kod bolesnika na hemodijalizi

U našem istraživanju izvršili smo genotipizaciju bolesnika i ispitanika iz kontrolne grupe za dva polimorfizma u *Klotho* genu (SNP *Klotho* G-395A i SNP *Klotho* C1818T). Dobijeni rezultati ukazuju da nije bilo značajne razlike u distribuciji genotipova i alela ispitivanih polimorfizama

poređenjem bolesnika na hemodijalizi i ispitanika iz kontrolne grupe. Imajući u vidu malu zastupljenost AA genotipa SNP *Klotho* G-395A u našoj populaciji bolesnika na HD, sve ispitanike smo svrstali u dve grupe, nosioce mutiranog alela u jednu, i bolesnike sa divljim genotipom u drugu grupu. Nosioci A alela (genotipovi AA i GA) bili su zastupljeni sa 31,7%, u odnosu na bolesnike koji nisu imali A alele u genotipu (drugu grupu činili su bolesnici sa GG genotipom). Za razliku od naših rezultata u istraživanju *Zeng* i saradnika distribucija nosioca A alela u krajnjem stadijumu bubrežne bolesti iznosila je 63,5% u poređenju sa 40% kod zdravih dobrovoljaca [259]. U studiji *Shimoizama* distribucija nosioca A alela kod zdravih ispitanika iznosila je 31,9% [260]. Iz navedenog prizilazi da je poznavanje populacione genetike značajno, i u domenu mineralno-koštanih poremećaja i kardiovaskularnih komplikacija kod bolesnika na hemodijalizi, upravo zbog etničkih razlika u distribuciji alela i genotipova.

U našoj populaciji nije bilo razlike u starosnoj strukturi između grupa u odnosu na alele SNP *Klotho* G395A. Međutim, nosioci A alela bili su značajno duže na hemodijalizi, a kao značajno mlađi su započeli hemodijalizno lečenje, što ide u prilog hipotezi da su imali bržu progresiju HBI u poređenju sa nosiocima G alela. U skladu sa našim rezultatima, korejska studija je pokazala da nosioci A alela pokazuju veću verovatnoću da dostignu terminalni stadijum HBI i smrtni ishod u poređenju sa nosiocima G alela [261]. U nedavno objavljenoj studiji na pedijatrijskoj populaciji kod bolesnika na hemodijalizi zastupljenost GA + AA genotipova *Klotho* G395A polimorfizma je bila znatno veća u odnosu na GG genotip. Učestalost A alela bila je znatno veća kod pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih ispitanika, što može ukazati na to da su nosioci A alela u predispoziciji za razvoj terminalnog stadijuma bubrežne slabosti [260], što potvrđuje našu hipotezu, da nosioci A alela imaju bržu progresiju HBI. To se može objasniti pretpostavkom da se proteini oslabljeno vezuju za *Klotho* promoterski region zbog G/A supstitucije, i da nosioci A alela formiraju manje DNK-proteinskih kompleksa nego u slučaju G alela, što rezultira smanjenom sintezom *Klotho* proteina. Navedena studija pokazuje značajno veću učestalost GG genotipa i G alela u kontrolnoj grupi, što sugerise na to da je G alel, divlji tip, protektivan za razvoj terminalnog stadijuma bubrežne slabosti.

U našem istraživanju poređenjem novih parametara mineralno-koštanog metabolizma sa ispitanicima iz kontrolne grupe, pokazano je da bolesnici na HD imaju značajno povišene

koncentracije FGF23, a snižene koncentracije vitamina D i *Klotho* proteina. Literaturni podaci pokazuju da nedostatak *Klotho* proteina značajno povećava apoptozu u kulturama endotelnih ćelija i ćelija bubrega, ali i da *Klotho* ima povoljne efekte na oštećenja izazavana oksidativnim stresom [262]. Pored toga, nedostatak *Klotho* protina nepovoljno utiče na regeneraciju bubrega nakon ishemijskih oštećenja u eksperimentalnim modelima. *Klotho*^{-/-} miševi pokazuju ozbiljne abnormalnosti vaskularnog endotela, angiogeneze i vaskulogeneze, dok dodavanje *Klotho* proteina značajno poboljšava regenerativna svojstva ćelija nakon ishemijskih oštećenja bubrega [263]. *Klotho* je anti-inflamatorni modulator, preko NF-κB negativno utiče na proizvodnju inflamatornih proteina poput MMP-9 (od *engl. matrix metalloproteinase 9*), IL-6 i TNF-α [264].

Klotho protein povoljno utiče na renalna, ali i ekstrarenalna, oštećenja koja su nastala kao posledica akutnog i hroničnog oštećenja bubrega [215]. Nedavno objavljena meta-analiza je pokazala da je *Klotho* G-395A polimorfizam značajno povezan sa incidencijom HBI, pošto su nosioci A alela pokazali povećani rizik od kardiovaskularnih bolesti u poređenju sa homozigotnim nosiocima G alela. Ovi nalazi naglašavaju zaštitni uticaj *Klotho* proteina na kardiovaskularni sistem, posebno kod bolesnika sa HBI, koji imaju smanjene koncentracije *Klotho* proteina, kod kojih vaskularne kalcifikacije i uremijska kardiomiopatija (koja se karakteriše hipertrofijom leve komore i značajnom fibrozom) predstavljaju najznačajnije komplikacije [5], što je u skladu sa našim rezultatima. U prilog ovome govori već pomenuta studija [213], gde je pokazana veća zastupljenost nosioca A alela u grupi ESKD ispitanika sa kardiovaskularnim komplikacijama, odnosno u grupi ispitanika sa HLK. Suprotno tome, nosioci G alela bili su zastupljeniji u grupi bolesnika bez kardiovaskularnih komplikacija. Stoga se A alel *Klotho* G-395A polimorfizma može smatrati korisnim markerom progresije HBI, ali i prediktorom kardiovaskularnih komplikacija kod bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne slabosti.

Varijacije u genu za *Klotho* protein dovode do promena u aktivnosti *Klotho* proteina [260], prema tome, polimorfni nosioci gena sintetišu neznatno strukturno različite ciljne proteine koji imaju različit poluživot ili različit afinitet vezivanja za receptore. U našem istraživanju, nosioci A alela, *Klotho* G-395A polimorfizma, imali su značajno niže koncentracije *Klotho* proteina u poređenju sa nosiocima G alela, što je u skladu sa podacima iz literature. Eksperimentalne studije

na životinjama ukazuju da nedostatak *Klotho* gena dovodi do degenerativnih promena na mnogim organima, smanjući očekivani životni vek, što dovodi do sindroma sličnom starenju, te se ovaj gen može okarakterisati kao *anti-ageing* gen [108]. Hronična bubrežna slabost smatra se prirodnim modelom ubrzanog starenja, jer gubitak bubrežnog tkiva rezultira smanjenom ekspresijom *Klotho* proteina, FGF23 se vezuje za FGF receptore smanjenim afinitetom, što dovodi do smanjuje izlučivanje fosfata. Nosioci A alela u našoj populaciji, pored smanjene koncentracije *Klotho* proteina, imali su povišene koncentracije FGF23 i nivo fosfata, što sugeriše da su izloženi povećanom riziku od neželjenih događaja na srce i krvne sudove.

Nekoliko studija je pokazalo korelaciju *Klotho* G-395A genskog polimorfizma i hipertenzije. Rhee i saradnici su pokazali znatno viši sistolni krvni pritisak kod nosioca A alela [212]. Dok su Vang i saradnici pokazali da polimorfizam G-395A može biti povezani sa esencijalnom hipertenzijom [260]. *Elghoroury* i saradnici objavili da je i sistolni i dijastolni pritisak bio veći kod nosioca GA i AA genotipova pre uključivanja na hemodijalizu u odnosu na bolesnike sa GG genotipom [213]. Za rliku od naših rezultata, gde nije bilo značajnih razlika između grupa u odnosu na genotipove G-395A *Klotho* polimorfizma, u pogledu sistolnog, dijastolnog i srednjeg arterijskog pritiska u trenutku uzimanja krvi (rezultati nisu prikazani), ali nije bilo ni značajnih razlika u distribuciji bolesnika sa hipertenzijom.

Drugi ispitivani polimorfizam u našoj populaciji je SNP *Klotho* C1818T (rs564481), smešten u egzonu 4 ljudskog *Klotho* gena, i povezan sa rizikom od vakularne disfunkcije, hipertenzije i bolesti koronarnih arterija [218, 265, 266]. U našoj ispitivanoj grupi nosioci T alela SNP *Klotho* C1818T (genotipovi CT i TT) su bili zastupljeniji u odnosu na nosioce C alela (CC genotip). Hipertenzija je bila zastupljenija kod bolesnika sa CC genotipom, bez značajnih razlika u odnosu na ostale ispitivane parametre.

Iako su podaci o *Klotho* genskom polimorfizmu ograničeni, veće razumevanje ovih interakcija može doprineti pronalasku novih terapijskih modaliteta. Ispitivanja na polju *Klotho* genskih manipulacija mogu poboljšati morfološke i funkcionalne promena na bubregu, nakon akutnih ili hroničnih oštećenja bubrega, i posledično smanjiti morbiditet i mortalitet. Ovo se pre svega

odnosi na bolesnike sa hroničnom bubrežnom slabošću i pratećim kardiovaskularnim komplikacijama.

6.3. Značaj parametara mineralno-koštanog metabolizma za hipertrofiju leve komore kod bolesnika na hemodijalizi

Još osamdesetih godina prošlog veka ehokardiografske studije su identifikovale strukturne promene na srcu kod bolesnika na hemodijalizi koje su nazvane uremijska kardiomiopatija. Danas su nove ehokardiografske tehnike omogućile analizu suptilnih subkliničkih promena u srčanoj geometriji i funkciji [216]. Ove promene mogu da predvide buduće kardiovaskularne događaje, što je od velikog značaja kod bolesnika na hemodijalizi, a sve sa ciljem sprečavanja negativnih ishoda.

Mineralno-koštani poremećaji su često prisuti kod bolesnika sa HBI ali i u opštoj populaciji. Hiperfosfatemija povezana sa povećanim kardiovaskularnim mortalitetom, javlja se kod bolesnika na hemodijalizi u mnogo mlađoj starosnoj dobi u poređenju sa opštom populacijom [267]. Kalcifikacije koronarnih arterija javljaju se kod mladih odraslih osoba sa malim rizikom za kardiovaskularne bolesti, dok su kalcifikacije srčanih zalistaka povezane sa visokom smrtnošću kod osoba starije životne dobi, i kod osoba sa kongestivnom srčanom slabošću [197, 268, 269]. U našem istraživanju THC skor (od engl. *Total Heart Calcification score*) dobijen na osnovu prisustva kalcifikacija na srčanim zaliscima bolesnike deli u 4 grupe. Više od 80% bolesnika svrstano je u grupe sa srednjim i izraženim kalcifikacijama, što predstavlja visok rizik za kardiovaskularne komplikacije. Na osnovu opservacionih studija smatra se da su vaskularne kalcifikacije snažan prediktor kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika sa HBI [270]. Kod bolesnika u terminalnom stadijumu bubrežne bolesti koji se leče hemodijalizom postoji 10-20 puta povećan rizik od kardiovaskularnog mortaliteta za u odnosu na opšu populaciju [271]. U našoj analizi preživljavanja, preminuli bolesnici su imali statistički značajno više vrednosti ehokardiografskog THC skora u odnosu na preživjele, dok se u multivarijantnoj regresionoj analizi THC skor izdvojio kao značajan prediktor kako opšteg, tako i kardiovaskularnog mortaliteta.

Hipertrofija leve komore je najčešća kardiovaskularna komplikacija, koja je zastupljena kod 60–80% bolesnika u terminalnom stadijumu HBI [272]. Najkarakterističnije morfološke promene koje se vide na srcu su proširenje srčane šupljine i progresivno zadebljanje zidova leve komore, koje su sve manje reverzibilne dužim ostankom na hemodijalizi [273]. Hipertrofija leve komore nastaje u sklopu adaptivnog remodelovanja radi smanjenja pritiska na zidu komora [274].

U našem istraživanju hipertrofija leve komore je bila prisutna kod 80,3% bolesnika, od kojih je koncentrična hipertrofija registrovana kod 62% od ukupnog broja ispitanika, odnosno kod 77,2% u grupi bolesnika sa hipertrofijom. U istraživanju sprovedenom u istom hemodijaliznom centru, kod 104 bolesnika, koje je analiziralo ulogu oksidativnog stresa na remodelovanje miokarda, pokazano je da 75% bolesnika ima hipertrofiju leve komore, što je usklad u sa našim rezultatima [275].

Poređenjem standardnih parametara mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa i bez hipertrofije leve komore, u našoj ispitivanoj grupi nije bilo značajne razlike. Takođe, nismo pokazali statistički značajne razlike između bolesnika sa različitim genotipovima, u oba ispitivana polimorfizma. Treba istaknuti da je HLK izuzetno multifaktorski proces, a hipertenzija vodeći uzrok. Iako nije bilo značajne razlike u distribuciji bolesnika sa hipertenzijom među ispitivanim grupama kod SNP *Klotho* G-395A, kardiovaskularni događaji su bili značajno zastupljeniji među nosiocima A alela, što ukazuje da su bili izloženi većem riziku za kardiovaskularni mortalitet.

Nekoliko studija je pokazalo da su promene u *Klotho* ekspresiji povezane sa razvojem hipertrofije leve komore srca, ali još uvek nisu svi mehanizmi u potpunosti jasni. Neki autori su opisali HLK kod *Klotho* deficijentnih miševa (bez stresa) u bazalnim uslovima [129, 276]. Suprotno tome, istraživanje koje je koristilo isti model pokazalo je da u bazalnim uslovima ne dolazi od srčane abnormalnosti, dok u prisustvu β adrenergičkog opterećenja miševi razvijaju veću hipertrofiju u poređenju sa miševima divljeg tipa [170]. Otkriveno je da su kardioprotektivni *Klotho* efekti posredovani inhibitornim efektima na TRPC6 katjonske kanale na površini kardiomiocita, te je kardioprotektivna uloga *Klotho* proteina u nastanku hipertrofije dokazana i u *in vitro* eksperimentima [170]. To je pokazano i u drugim studijama, neonatalni

kardiomiociti tretirani su angiotenzinom II radi indukovanja ćelijske hipertrofije. U prisustvu *Klotho* proteina ćelijska površina se smanjuje i dolazi do snižavanja nivoa β MHC proteina (od engl. *β myosin heavy chain*), što podržava ideju da *Klotho* povoljno utiče na hipertrofiju [277]. Za razliku od literaturnih podataka, u našem istraživanju nije uočena značajna razlika u koncentraciji *Klotho* proteina kod bolesnika sa i bez hipertrofije.

Iako je bubreg glavni izvor *Klotho* proteina, pokazano je da nakon izlaganja stresu i u srcu postoji *Klotho* ekspresija. Shodno tome, opisano je da miševi sa nedostatkom *Klotho* proteina ne mogu da povećaju srčanu frekvenciju pod stresom, sa posledičnom iznenadnom srčanom smrću zbog disfunkcije sinoatrijalnog čvora (SA) [278]. Ova studija podržava ideju da je *Klotho* bitan za normalnu funkciju SA čvora i adekvatan srčani ritam. Pored toga, nedavna studija je pokazala da postoji *Klotho* ekspresija u miokardu ljudi, odnosno da je ekspresija *Klotho* smanjena u bolesnika sa većim rizikom od kardiovaskularnih bolesti [72]. Iako je mali broj kliničkih studija opisalo povezanost smanjenog nivoa *Klotho* proteina sa kardiovaskularnim mortalitetom u opštoj populaciji, pojedine studije ukazuju na korelaciju između nivoa *Klotho* proteina i starosti [279, 280], odnosno da je *Klotho* nezavisni prediktor opšteg mortaliteta kod starije populacije [281]. Veruje se da je povišen nivo *Klotho* proteina kod starijih ljudi povezan sa manjim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti, čak i nakon prilagođavanja za tradicionalne faktori rizika za kardiovaskularne bolesti [166]. Kod starijih bolesnika sa očuvanom ejakcionom frakcijom, ali sa dijastolnom disfunkcijom leve komore, zabeležen je niži nivo *Klotho* proteina. Zbog njegovih *anti-aging* efekata čini se da je *Klotho* deficit povezan sa kardiovaskularnim oštećenjem kod bolesnika starije životne dobi. Ipak, potrebno je više studija da bismo bolje razumeli ulogu *Klotho* u srcu u uslovima stresa.

Hipertrofija leve komore i kardiomiopatija su usko povezane sa fibrozom. Nedavne studije dovode u vezu hipertenzivnu bolest srca sa srčanom fibrozom. Miofibroblasti, fenotipski transformisani fibroblasti, prisutni su u srcu nakon oštećenja tkiva. Međutim, miofibroblasti su takođe uključeni u remodelovanje leve komore [282, 283]. Liu i saradnici ispitivali su ulogu rastvorljivog *Klotho* proteina u fibrozi miokarda i hipertenziji [282]. Poredili su kulture miofibroblast sa rastvorljivim *Klotho* proteinom, najpre sa izoformom od 130 kDa, a zatim sa izoformom od 65 kDa. Kao rezultat tretmana sa izoformom od 130 kDa primećena je

intenzivnija proliferacija miofibroblasta i pojačana sinteza kolagena tipa I u testiranim ćelijama. *Klotho* izoforma od 130 kDa je obavezni deo receptorskog kompleksa (*Klotho* – FGFR) za FGF23, dakle regulacija aktivnosti miofibroblasta usled tretiranja izoformom od 130 kDa posredovano je FGF23 [73, 282]. Suprotno tome, izoforma *Klotho* od 65 kDa je smanjila proliferaciju i proizvodnju kolagena u miofibroblastima. Ovi nalazi su takođe potvrđeni u *in vivo* ispitivanjima na miševima sa hipertenzijom. Postojala je intenzivnija intersticijalna fibroza srca u *Klotho* diferencijaciji miofibroblasta tretiranih izoformom od 130 kDa, dok izoforma od 65 kDa ima antifibrotski efekat [282]. Ovaj novi nalaz pokazuje da rastvorljivi *Klotho* ima suprotnu regulatornu ulogu u srčanoj fibrogenezi i može otvoriti nove mogućnosti u terapiji bolesti srca.

Miofibroblasti se pojavljuju tokom remodeliranja miokarda nakon oštećenja srca i regeneracije povređenog tkiva. Oni igraju ulogu u sintezi kolagena i oblikovanju ožiljaka. Miofibroblasti takođe mogu sprečiti dilataciju infarktnog područja održavanjem vanćelijskog matriksa u ožiljku [284]. Dakle, primena rastvorljivog *Klotho* proteina od 130 kDa pojačava proliferaciju i diferencijaciju miofibroblasta i dovodi do poboljšanja srčane funkcije [282]. Stimulativna uloga *Klotho* od 130 kDa u ćelijskoj proliferaciji zabeležena je i kod drugih vrsta ćelija, kao što su osteoblastične ćelijske linije kod miševa i epitelne ćelije proksimalnih tubula [285, 286]. S druge strane, taloženje vanćelijskog matriksa na mestima udaljenim od infarktnog područja može dovesti do smanjenja kontraktilnosti srca i srčanog zastoja [284]. Zbog toga, tretman izoformom od 65 kDa inhibira proliferaciju miofibroblasta i sintezu kolagena i može da ima antifibrotski efekat u srčanoj reparaciji [282]. Treba napomenuti da samo nekoliko eksperimentalnih studija odvojeno posmatra uticaj izoformi rastvorljivog *Klotho* proteina. Postojanje različitih izoformi *Klotho* proteina pokazano je u ćelijama pankreasa i matičnim ćelijama masnog tkiva, što podržava hipotezu o različitim uticajima izoformi *Klotho* proteina [287-289]. Mehanizam odgovoran za inhibitornu i antifibrotsku ulogu izoforme od 65 kDa ostaje nepoznat. Potrebna su dalja ispitivanja kako bi se otkrili receptori za rastvorljivi *Klotho* od 65 kDa. Pored toga, teško je razlikovati rastvorljiv *Klotho* pune dužine od kratkih fragmenata, kao i od izlučene forme. Ovo bi mogao biti razlog zašto istraživači ne prave razliku između tretmana izoformama *Klotho* i ne uzimaju u obzir njihove sumnje u diferencijalni efekat, već uglavnom opisuju administraciju samo rekombinantnog *Klotho* proteina. Studija Liu i saradnika (iz 2016) istakla je povoljnu

upotrebu rastvorljivih izoformi *Klotho* proteina kao potencijalnu strategiju za razvoj novih terapijskih protokola u kardiologiji [282].

Pored poznate fosfaturične aktivnosti FGF23, postoji dosta dokaza o važnim nefosfaturičnim efektima FGF23 na srce. Na primer, povećani nivo FGF23 u cirkulaciji povezan je sa nekoliko strukturnih i funkcionalnih promena srca i postoji snažna povezanost između nivoa FGF23 u serumu i atrijalnog prečnika kod pacijenata bez prethodne kardiovaskularne bolesti i atrijalne fibrilacije, nezavisno od tradicionalnih kardiovaskularnih faktora rizika ili oštećenja bubrežne funkcije [290, 291].

Dobijeni rezultati našeg istraživanja ukazuju da nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji FGF23 u odnosu na hipertrofiju leve komore, iako su bolesnici sa hipertrofijom imali više vrednosti, verovatno zbog malog studijskog uzorka. FGF23 ima direktan uticaj, nezavisno od *Klotho*, na kardiomiocite u etiopatogenezi HLK. FGF23 uzrokuje patološku hipertrofiju izolovanih kardiomiocita preko FGF receptora aktivacijom kalcineurin-NFAT signalnog puta (nuklearni faktor aktiviranih T ćelija / *nuclear factor of activated T cells*). Intramiokardna i intravenska aplikacija FGF23 kod miševa sa nedostatkom *Klotho* proteina dovodi do razvoja HLK, dok blokiranje FGF receptora može usporiti razvoj HLK [129, 292, 293]. Nekoliko studija je otkrilo jaku povezanost između FGF23 i hipertrofije leve komore [129, 276, 294, 295] ili disfunkcija leve komore čak i u odsustvu HLK [294]. U CHS studiji (od engl. *Cardiovascular Heart Study*), otkriveno je da su pacijenti sa višim nivoom FGF23 izloženi većem riziku za srčanu insuficijenciju [296]. Otkriveno je da pacijenti sa sistolnom srčanom slabošću imaju visok nivo FGF23 [297], suprotno tome, još uvek nije pronađena jasna povezanost između nivoa FGF23 i učestalost IM [296, 298]. FGF23 nedavno je predložen kao obećavajući biomarker za ranu stratifikaciju rizika preživelih bolesnika nakon infarkta miokarda sa ST-elevacijom (STEMI), radi poboljšavanja predviđanja remodelovanja leve komore klasičnim biomarkerima srčanog stresa (NT-proBNP) ili inflamatornog stanja (hs-CRP) [299]. Ova klinička istraživanja podržavaju snažnu nezavisnu povezanost između FGF23 u serumu i povećanog rizika od kardiovaskularnih događaja.

Uprkos obilju relevantnih kliničkih podataka, ostaje nejasno da li je FGF23 uzrok ili posledica kardiovaskularnih bolesti. Zanimljivo je da je nekoliko studija pokazalo da kardiomiociti pod stresom mogu indukovati sopstvenu sintezu FGF23 [72, 300, 301], predstavljajući novu paradigmu da srce reaguje na lokalno oštećenje sintetišući FGF23 i podupirući tezu da to može biti posledica patoloških događaja. U poslednjih nekoliko godina, uloženo je mnogo napora da se identifikuju patofiziološki mehanizmi koji su uključeni u kardiotoksične efekte FGF23. Izgleda da su kardiološki efekti FGF23 uglavnom vezani za FGF-receptor 4 (FGFR4), izoformu sa većim afinitetom prema FGF-23 u srcu [195, 302]. U tom smislu, studija *Faula* i saradnika je po prvi put pokazala da [272] patološki nivoi FGF23 (10, 25 i 100 ng / mL) indukuje hipertrofiju kardiomiocita nezavisano od *Klotho* signalizacije [252]. U skladu sa ovim *in vitro* dokazima utvrđeno je da je hronična administracija blokatora pan-FGF receptora smanjila HLK kod 5/6 nefrektomisanih pacova (klasični eksperimentalni HBI model, gde je visok nivo FGF23 u serumu). Tako je, bar u ovom modelu, FGF23 aktivan u razvoju uremijske kardiomiopatije [129]. Slični nalazi srčane hipertrofije su prijavljeni kod miševa sa nedostatkom *Klotho* proteina [106], koji je razvijen kao model preranog starenja, a karakteriše ga hiperfosfatemija i visok nivo FGF23 [301].

Studije u kojima dolazi do direktnog oštećenja srca bile su vrlo korisne u testiranju da li je FGF23 patofiziološki faktor za progresiju srčane disfunkcija. Aortna stenozna - TAC model (od engl. *transverse aortic constriction*) je eksperimentalni model srčane hipertrofije izazvane preopterećenjem, koji izaziva snažno povećanje serumskog FGF23, praćeno povećanjem srčane ali ne i koštane FGF23 ekspresija, pokazujući da je srce samo sposobno da produkuje FGF23, pod opterećenjem [272]. Zanimljivo je da je ista studija pokazala da se hipertrofija takođe razvila i kod FGF23 *knockout* miševa, što ukazuje da FGF23 možda nije jedini faktor koji dovodi do srčane hipertrofije uzrokovane pritiskom. Moguće objašnjenje za usaglašavanje ovih nalaza sa onima koji pokazuju aktivnu ulogu FGF23 u hipertrofiji kod nefrektomisanih pacova [272], bilo bi da iako je primećeno povećanje FGF23 u pomenutim modelima, možda dolazi i do aktiviranja različitih prohipertrofičnih medijatora koji možda imaju različite puteve od FGFR – FGF23 signalizacije.

Ovi klinički i eksperimentalni podaci pokazuju usku vezu između oštećenja srca i FGF23, i podržavaju koncept da FGF23 može biti jači srčani nego što je bubrežni toksin. Fosfaturično delovanje FGF23 štiti od sistemskog opterećenje fosfatima, ali istovremeno pokreće urođena oštećenja srca. Međutim, specifični srčani mehanizmi posredovani FGF23, posebno oni koji su uključeni u modulaciji kardiomiocitnih kontraktilnih svojstava koja dovode do srčane disfunkcije tek treba da budu razjašnjeni.

Pored FGF23 i *Klotho* proteina, i vitamin D može u značajnoj meri uticati na kardiovaskularne komplikacije kod bolesnika sa dijalizi. Pacijenti na hemodijalizi pate od nedostatka vitamina D [303], što je u skladu sa našim dobijenim rezultatima. Literaturni podaci pokazuju da nedostatak aktivnog oblika vitamina D (kalcitriol) utiče na vaskularne glatko-mišićne ćelije putem citoplazmatskih vitamin D receptora (VDR), što dovodi do hiperplazije i hipertrofije kardiomiocita. Brisanje gena za vitamin D receptore u kardiomiocitima dovodi do HLK [304]. Terapija vitaminom D ima kardioprotektivni efekat kroz modulaciju sistema renin-angiotenzin usled direktne supresije renin ekspresije kalcitriolom, bez obzira na efekat vitamina D na metabolizam kalcijuma [305]. Međutim, efekti vitamina D na ishod pacijenata sa HBI su kontroverzni, pa neka istraživanja pokazuju da višak vitamina D predstavlja rizik od hiperkalcemije i vaskularne kalcifikacije što povećava morbiditet [306].

Aktivni oblik vitamina D (1,25-dihidroksi vitamin D) prelazi ćelijsku membranu i u citoplazmi ide do vitamina D receptora (VDR), koji se mogu vezati za receptore retinoične kiseline, predstavljajući faktore transkripcije koji mogu da moduliraju ekspresiju gena [307]. Pored klasičnog genomskog odgovora, raspoloživi podaci podržavaju mišljenje da 1,25-dihidroksivitamin D može indukovati brze reakcije, putem VDR, na plazma membrani, uključujući modulaciju jonskih kanala i signalnih puteva [308, 309]. Identifikacija VDR u raznim vrstama ćelija, uključujući endotelne ćelije, vaskularne glatko-mišićne ćelije i kardiomiocite, ide u prilog ulozi vitamina D i kod van skeletnih bolesti [310].

Nedostatak vitamina D i dalje je veoma rasprostranjen širom sveta i zahvata 30-50% opšteg stanovništva [311]. Brojne opservacione i prospektivne studije su ispitivale nedostatak vitamina D i povezanost sa mnogim komorbiditetima, uključujući kardiovaskularne. Pokazana je jasna

povezanost između deficita vitamina D kardiovaskularnih bolesti (koronarna bolest, srčana insuficijencija i moždani udar) [312-316]. Iako su istraživanja pokazala da vitamin D može imati značajnu ulogu u remodelovanju miokarda, kod naših bolesnika sa hipertrofijom, iako su imali snižene vrednosti vitamina D, nije dokazana značajna razlika u odnosu na bolesnika bez hipertrofije, što je verovatno posledica relativno malog broja bolesnika. Postoji sve veći broj dokaza koji pokazuju modulatorne efekte vitamina D na mehanizme za koje je poznato da su važni u razvoju srčane insuficijencije, a koje karakteriše hipertrofija, fibroza, kontraktilna disfunkcija, neurohormonalna aktivacija i inflamacija. Ispitivanja na klasičnom modelu hipertenzije, pokazuju da lečenje parikalciolom, aktivnim analogom vitamina D, može inhibirati razvoj hipertrofije i disfunkciju leve komore bez smanjenja krvnog pritiska [317]. Koristeći isti eksperimentalni model, *Bae* i saradnici pokazali su da parikalciol usporava progresiju postojeće srčane hipertrofije i razvoj srčane slabosti [318]. Korišćenjem animalnog modela hirurški indukovano infarkta miokarda kod miševa, ista grupa je pokazala da parikalciol smanjuje razvoj srčane slabosti, smanjujući infarktnu površinu kao i markere inflamacije, fibroze, apoptoze i aktivaciju renin-angiotenzin aldosteron sistema [319].

Prediktivne modele smo formirali da bismo utvrdili prediktivnu moć varijacija u genu za *Klotho* protein i novih parametara mineralno-koštanog metabolizma za nastanak hipertrofije leve komore kod bolesnika na hemodijalizi. Prediktivni potencijal različitih modela, procenjivali smo na osnovu površine pod krivom (AUC), a same performanse modela pretili smo na osnovu NRI i IDI parametara. Sve modele smo upoređivali sa bazičnim modelom koga su činili standardni parametri mineralno-koštanog metabolizma (Ca, P, ALP i PTH). Najbolja reklasifikacija u odnosu na nastanak hipertrofije leve komore je postignuta uključivanjem *Klotho* proteina, FGF23, vitamina D i A alela *Klotho* G-395A polimorfizma. Ovaj model za 82% vrši bolju reklasifikaciju bolesnika, u odnosu na model sa standardnim parametrima mineralno-koštanog metabolizma. U nedavnom istraživanju *Hu* i saradnika opisani su slični rezultati koji pokazuju zajedničke efekte niskog *Klotho* proteina i visokog fosfata na hipertrofiju leve komore i fibrozu. Njihovi rezultati pokazuju da su *Klotho* i fosfati nezavisni prediktori za remodelovanje leve komore, a da je FGF23 treći prediktor, ali samo ako su nivoi *Klotho* proteina smanjeni [5].

6.4. Uticaj parametara mineralno-koštanog metabolizma i ispitivanih *Klotho* polimorfizama na preživljavanje kod bolesnika na hemodijalizi

Imajući u vidu značaj parametara mineralno-koštanog metabolizma u nastanku hipertrofije leve komore i kardiovaskularnih poremećaja bolesnika na hemodijalizi, ispitivali smo njihov uticaj na preživljavanje. U petogodišnjem periodu praćenja prosečno vreme preživljavanje je bilo oko 43 meseca ($42,95 \pm 1,40$). Preminulo je 74 bolesnika (52,1%), od kojih skoro polovina od kardiovaskularnih bolesti (47,3%), odnosno četvrtina ispitivane populaciju (24,6%). Slični rezultati u pogledu preživljavanja pokazani su u ranijoj našoj studiji, gde je 186 bolesnika na hemodijalizi praćeno tokom tri godine [320].

Poređenjem kliničko biohemijskih parametara između preminulih i preživelih bolesnika na hemodijalizi u petogodišnjem periodu, pokazali smo da su preminuli bolesnici stariji, bez značajne razlike između polova. Vrednosti kreatinina, CRPa, broja leukocita i GGTA su bile značajno više među preminulim, dok su nivo albumina i glikemija bili značajno niži. Ostali ispitivani parametri nisu pokazali statistički značajnu razliku. U skladu sa našim rezultatima je i ranije sprovedena studija u istom hemodijaliznom centru, gde je analizirana prediktivna vrednosti parametara endotelne disfunkcije (asimetričnog dimetilarginina), malnutricije (albumini) i inflamacije (CRP i serumskog amiloida) za mortalitet, kod 153 bolesnika na hemodijalizi [224]. Pokazano je, između ostalog, da su hipoalbuminemija i povišene vrednosti CRPa prediktori mortaliteta bolesnika na hemodijalizi.

Analizom parametara mineralno-koštanog metabolizma pokazali smo da su preminuli bolesnici imali značajno niže koncentracije *Klotho* proteina i vitamina D u odnosu na preživeli, bez značajne razlike u koncentraciji FGF23. Međutim, sva tri nova parametra mineralno-koštanog metabolizma (*Klotho* protein, FGF23 i vitamin D) su se pokazali kao statistički značajni prediktori opšte smrtnosti, na osnovu univarijantne regresione analize. U modelu multivarijantne regresione analize statističku značajnost u predikciji opšte smrtnosti zadržali su *Klotho* protein i FGF23, što je pokazano i u drugim studijama [321-324].

Povećane koncentracije FGF23 u serumu povezane su sa opštom, a posebno sa kardiovaskularnom smrtnošću [321, 325-327]. Nekoliko studija je pokazalo jasnu povezanost

između FGF23 i rizika od smrti, čak i nakon prilagođavanja za tradicionalne faktore rizika, što je u skladu sa našim rezultatima. Ova povezanost je prisutna i kod bolesnika sa HBI i kod bolesnika bez bubrežne slabosti, čak i kada serumska koncentracija FGF23 nije ekstremno visoka [129, 321, 322, 325, 328].

U studiji *Kurosu-a* i saradnika deficit *Klotho* proteina je povezan sa preranom smrću, što je u skladu sa našim rezultatima, dok je prekomerna ekspresija *Klotho* gena povezana sa dugovečnošću [329]. Takođe, *Klotho* protein ima važnu ulogu u predviđanju rizika od kardiovaskularnih događaja ili mortaliteta na životinjskim modelima, ali i u nekim kliničkim studijama [5, 323, 330]. U japanskoj kliničkoj studiji pokazano je da su bolesnici na hemodijalizi sa sniženim vrednostima *Klotho* proteina imali značajno veću stopu opšteg i kardiovaskularnog mortaliteta [331]. U studiji *Marcais* i saradnika na 769 bolesnika na hemodijalizi, pokazano je da su bolesnici sa koncentracijama *Klotho* proteina iznad prvog kvartila imali manje kardiovaskularnih događaja i manju stopu kardiovaskularnog mortaliteta [332]. U studiji na 128 bolesnika na hemodijalizi, takođe je pokazano da je niska koncentracija *Klotho* proteina povezana sa većim kardiovaskularnim rizikom [324, 331].

Pored sniženih koncentracija *Klotho* proteina i varijacije u genu za *Klotho* protein su povezane sa lošim preživljavanjem kod bolesnika sa uznapredovalom bubrežnom bolešću [214, 333]. U skladu sa ovim rezultatima je i studija i *Ko* i saradnika u kojoj je ispitivan polimorfizma *Klotho* G-395A kod bolesnika sa IgA nefropatijom, koja je pokazala da nosioci A alela imaju veću verovatnoću za razvoj ESRD, ali i veći mortalitet [261]. U našoj ispitivanoj populaciji nije utvrđena značajna razlika između različitih genotipova ispitivanih *Klotho* polimorfizama (*Klotho* G-395A i C1818T) u odnosu na smrtni ishod. U korejskoj multicentričnoj studiji tokom tri godine praćeno je 478 bolesnika na hemodijalizi, ispitivan je uticaj *Klotho* G-395A i C1818T polimorfizama na preživljavanje [214]. Za razliku od naših rezultata, mortalitet je bio značajno veći u grupi nosioca A alela G-395A polimorfizma (genotipovi GA i AA) u odnosu na nosioce G alela (genotip GG). Nije pokazana značajna razlika kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* C1818T polimorfizama u odnosu na preživljavanje, što je u skladu sa našim rezultatima.

*

* *

Poremećaji mineralno-koštanog metabolizma neminovno dovode do negativnih posledica, pre svega na kardiovaskularni sistem, značajno remete kvalitet života i smanjuju stopu preživljavanja bolesnika na hemodijalizi. Stoga su prevencija i lečenje jako važni. Nažalost, do danas nije dokazan nijedan tretman koji u potpunosti normalizuje poremećaj mineralno-koštanog metabolizma, jednom pokrenut proces ima tendenciju da napreduje i ne može se u potpunosti zaustaviti ili preokrenuti, te je stoga prevencija i otkrivanje bolesnika u ranim stadijumima od velike važnosti. Dosadašnja saznanja svedoče da je *Klotho* protein bitna komponentna mineralno-koštanog metabolizma, koji verovatno različitim mehanizmima utiče na kardiovaskularne poremećaje u odnosu na poznate mehanizme tradicionalnih faktora rizika. Potrebna su dalja istraživanja, veće multicentrične studije, kako u opštoj tako i u populaciji bolesnika sa HBI, da bi se bolje razumela uloga *Klotho* proteina u kompleksnim patofiziološkim mehanizmima, sa ciljem poboljšanja postojećih modaliteta lečanja i implementacije novih.

7. ZAKLJUČCI

Imajući u vidu postavljene ciljeve, na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Kod bolesnika na hemodijalizi su povećane koncentracije fosfata, paratireoidnog hormona i alkalne fosfataze, dok je koncentracija kalcijuma smanjena u poređenu sa ispitanicima iz kontrolne grupe.
- Koncentracije *Klotho* proteina i vitamina D su smanjene, dok je koncentracija FGF23 povećana kod bolesnika na hemodijalizi u odnosu na ispitanike iz kontrolne grupe.
- Dobijeni rezultati ukazuju da nema značajne razlike u distribuciji genotipova i alela ispitivanih polimorfizama u genu za *Klotho* protein; SNP *Klotho* G-395A i SNP *Klotho* C1818T, kod bolesnika na hemodijalizi i ispitanika iz kontrolne grupe.
- Nosioци A alela SNP *Klotho* G-395A su značajno duže na hemodijalizi, a značajno mlađi započeli hemodijalizno lečenje, što ide u prilog hipotezi da imaju bržu progresiju HBI u poređenju sa nosiocima G alela.
- Ispitivanjem standardnih parametara mineralno-koštanog metabolizma utvrđeno je da je koncentracija fosfora veća kod nosioca A alela SNP *Klotho* G-395A, dok nije bilo značajne razlike u koncentracijama paratireoidnog hormona i kalcijuma.
- Ispitivanjem novih parametara mineralno-koštanog metabolizma utvrđeno je da nosioци A alela *Klotho* G-395A polimorfizma imaju smanjene koncentracije *Klotho* proteina i povišene koncentracije FGF23, bez značajne razlike u koncentraciji vitamina D.
- Nije utvrđena statistički značajna razlika u standardnim i novim parametarima mineralno-koštanog metabolizma kod bolesnika sa različitim genotipovima *Klotho* C1818T polimorfizma. Utvrđeno je da je hipertenzija zastupljenija kod bolesnika sa CC genotipom SNP *Klotho* C1818T.

- Na osnovu ehokardiografske studije utvrđeno je da više od 80% bolesnika ima hipertrofiju leve komore, sa najvećom zastupljenošću koncentričnog tipa.
- Vredosti standardnih i novih parametara mineralno-koštanog metabolizma se nisu značajno razlikovale kod bolesnika sa i bez hipertrofije leve komore.
- Nije utvrđena statistički značajna razlika u morfologiji leve komore kod bolesnika na hemodijalizi sa različitim genotipovima ispitivanih *Klotho* genskih polimorfizama.
- Novi parametri mineralno-koštanog metabolizma imaju bolji prediktivni potencijal za hipertrofiju leve komore u odnosu na standardne. Najbolja reklasifikacija bolesnika za nastanak hipertrofije leve komore je postignuta uključivanjem *Klotho* proteina, FGF23, vitamina D i *Klotho* G-395A polimorfizma.
- U petogodišnjem periodu praćenja utvrđena je visoka smrtnost kod bolesnike na hemodijalizi, kod polovine je kao neposredni uzrok smrti bio kardiovaskularni događaj.
- Analizom preživljavanja pokazali smo da su preminuli bolesnici na hemodijalizi imali značajno niže vrednosti *Klotho* proteina i vitamina D u odnosu na preživjele, bez postajanja značajne razlike u koncentraciji FGF23.
- Nije utvrđena značajna razlika između genotipova ispitivanih *Klotho* polimorfizama i hipertrofije leve komore u odnosu na smrtni ishod kod bolesnika na hemodijalizi.
- Prediktori opšteg mortaliteta kod bolesnika na hemodijalizi su snižene koncentracije *Klotho* proteina, povišene vrednosti FGF23 i veće vrednosti THCs.

*

* *

Naše istraživanje je pokazalo značaj *Klotho* G-395A polimorfizma kod bolesnika na hemodijalizi, jer nosioci A alela imaju bržu progresiju hronične bubrežne slabosti, smanjene koncentracije *Klotho* proteina i povišene FGF23 i fosfora, što sugeriše da su izloženi povećanom riziku od neželjenih događaja na srce i krvnim sudovima. Pokazan je prediktivni značaj novih parametara mineralno-koštanog metabolizma u nastanku hipertrofije leve komore, ali i u predikciji mortaliteta. Bolje razumevanje patofizioloških mehanizama, međusobna povezanost standardnih i novih komponenti mineralnog metabolizma, kao i njihova povezanost sa kardiovaskularnim morbiditetom i mortalitetom, dovodi do dodatnih saznanja i omogućava bolju stratifikaciju faktora rizika. Poznavanje varijacija u genu za *Klotho* protein doprinosi personalizovanom pristupu, što uz primenu adekvatnih terapijskih mera i postupaka teži poboljšanju kvaliteta života i dužem preživljavanju bolesnika na hroničnom programu hemodijalize.

8. REFERENCE

1. Saran R, Robinson B, Abbott KC, Agodoa LYC, Bragg-Gresham J, Balkrishnan R, Bhavane N, Dietrich X, Ding Z, Eggers PW *et al*: **US Renal Data System 2018 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States**. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2019, **73**(3s1):A7-a8.
2. De Nicola L, Zoccali C: **Chronic kidney disease prevalence in the general population: heterogeneity and concerns**. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2016, **31**(3):331-335.
3. Kanjevac T, Bijelic B, Brajkovic D, Vasovic M, Stolic R: **Impact of Chronic Kidney Disease Mineral and Bone Disorder on Jaw and Alveolar Bone Metabolism: A Narrative Review**. *Oral health & preventive dentistry* 2018, **16**(1):79-85.
4. Blau JE, Collins MT: **The PTH-Vitamin D-FGF23 axis**. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2015, **16**(2):165-174.
5. Hu MC, Shi M, Cho HJ, Adams-Huet B, Paek J, Hill K, Shelton J, Amaral AP, Faul C, Taniguchi M *et al*: **Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling**. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(6):1290-1302.
6. Neyra JA, Hu MC: **Potential application of klotho in human chronic kidney disease**. *Bone* 2017, **100**:41-49.
7. Luo L, Hao Q, Dong B, Yang M: **The Klotho gene G-395A polymorphism and metabolic syndrome in very elderly people**. *BMC Geriatr* 2016, **16**:46-46.
8. Chonchol M, Greene T, Zhang Y, Hoofnagle AN, Cheung AK: **Low Vitamin D and High Fibroblast Growth Factor 23 Serum Levels Associate with Infectious and Cardiac Deaths in the HEMO Study**. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2016, **27**(1):227-237.
9. Levey AS, Becker C, Inker LA: **Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review**. *Jama* 2015, **313**(8):837-846.
10. Stevens PE, Levin A: **Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline**. *Annals of internal medicine* 2013, **158**(11):825-830.
11. Chen TK, Knicely DH, Grams ME: **Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review**. *Jama* 2019, **322**(13):1294-1304.
12. Morton RL, Schlackow I, Mihaylova B, Staplin ND, Gray A, Cass A: **The impact of social disadvantage in moderate-to-severe chronic kidney disease: an equity-focused systematic review**. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2016, **31**(1):46-56.
13. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J: **Global burden of hypertension: analysis of worldwide data**. *Lancet (London, England)* 2005, **365**(9455):217-223.
14. Hildebrandt F: **Genetic kidney diseases**. *Lancet (London, England)* 2010, **375**(9722):1287-1295.
15. Smyth LJ, Duffy S, Maxwell AP, McKnight AJ: **Genetic and epigenetic factors influencing chronic kidney disease**. *American journal of physiology Renal physiology* 2014, **307**(7):F757-776.
16. Reddy MA, Natarajan R: **Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases**. *Kidney international* 2015, **88**(2):250-261.
17. Dwivedi RS, Herman JG, McCaffrey TA, Raj DS: **Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease**. *Kidney international* 2011, **79**(1):23-32.

18. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX: **Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006, **17**(7):2034-2047.
19. Thompson S, James M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Manns B, Klarenbach S, Tonelli M: **Cause of Death in Patients with Reduced Kidney Function.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(10):2504-2511.
20. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M: **The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases.** *Kidney international* 2011, **80**(12):1258-1270.
21. James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M: **Early recognition and prevention of chronic kidney disease.** *Lancet (London, England)* 2010, **375**(9722):1296-1309.
22. Meguid El Nahas A, Bello AK: **Chronic kidney disease: the global challenge.** *Lancet (London, England)* 2005, **365**(9456):331-340.
23. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, Kasiske BL, Eckardt KU: **The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report.** *Kidney international* 2011, **80**(1):17-28.
24. Yuan J, Zou XR, Han SP, Cheng H, Wang L, Wang JW, Zhang LX, Zhao MH, Wang XQ: **Prevalence and risk factors for cardiovascular disease among chronic kidney disease patients: results from the Chinese cohort study of chronic kidney disease (C-STRIDE).** *BMC nephrology* 2017, **18**(1):23.
25. Muntner P, Anderson A, Charleston J, Chen Z, Ford V, Makos G, O'Connor A, Perumal K, Rahman M, Steigerwalt S *et al*: **Hypertension awareness, treatment, and control in adults with CKD: results from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study.** *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2010, **55**(3):441-451.
26. **A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control.** *The New England journal of medicine* 2017, **377**(25):2506.
27. Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt KU, Feyzi JM, Ivanovich P, Kewalramani R, Levey AS *et al*: **A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease.** *The New England journal of medicine* 2009, **361**(21):2019-2032.
28. Wiederkehr M, Krapf R: **Metabolic and endocrine effects of metabolic acidosis in humans.** *Swiss medical weekly* 2001, **131**(9-10):127-132.
29. Gaggl M, Sliber C, Sunder-Plassmann G: **Effect of oral alkali supplementation on progression of chronic kidney disease.** *Current hypertension reviews* 2014, **10**(2):112-120.
30. Novak M, Winkelman JW, Unruh M: **Restless Legs Syndrome in Patients With Chronic Kidney Disease.** *Seminars in nephrology* 2015, **35**(4):347-358.
31. Ketteler M, Elder GJ, Evenepoel P, Ix JH, Jamal SA, Lafage-Proust MH, Shroff R, Thadhani RI, Tonelli MA, Kasiske BL *et al*: **Revisiting KDIGO clinical practice guideline on chronic kidney disease-mineral and bone disorder: a commentary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes controversies conference.** *Kidney international* 2015, **87**(3):502-528.
32. Goldsmith DJ, Covic A, Fouque D, Locatelli F, Olgaard K, Rodriguez M, Spasovski G, Urena P, Zoccali C, London GM *et al*: **Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guidelines: a European Renal Best Practice (ERBP) commentary statement.** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2010, **25**(12):3823-3831.
33. Fujii H, Joki N: **Mineral metabolism and cardiovascular disease in CKD.** *Clinical and experimental nephrology* 2017, **21**(Suppl 1):53-63.
34. Goldsmith D, Ritz E, Covic A: **Vascular calcification: a stiff challenge for the nephrologist: does preventing bone disease cause arterial disease?** *Kidney international* 2004, **66**(4):1315-1333.

35. Goldsmith DJ, Covic A: **Calcium and the saga of the binders: accumulating controversy, or building consensus?** *International urology and nephrology* 2008, **40**(4):1009-1014.
36. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Bilo HJ, Chalmers J, Heerspink HJ, Lee BJ, Perkins RM, Rossing P, Sairenchi T *et al*: **Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis.** *Lancet (London, England)* 2012, **380**(9854):1662-1673.
37. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY: **Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization.** *The New England journal of medicine* 2004, **351**(13):1296-1305.
38. Wanner C, Amann K, Shoji T: **The heart and vascular system in dialysis.** *Lancet (London, England)* 2016, **388**(10041):276-284.
39. Bansal N, Katz R, Robinson-Cohen C, Odden MC, Dalrymple L, Shlipak MG, Sarnak MJ, Siscovick DS, Zelnick L, Psaty BM *et al*: **Absolute Rates of Heart Failure, Coronary Heart Disease, and Stroke in Chronic Kidney Disease: An Analysis of 3 Community-Based Cohort Studies.** *JAMA cardiology* 2017, **2**(3):314-318.
40. Xie X, Atkins E, Lv J, Bennett A, Neal B, Ninomiya T, Woodward M, MacMahon S, Turnbull F, Hillis GS *et al*: **Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: updated systematic review and meta-analysis.** *Lancet (London, England)* 2016, **387**(10017):435-443.
41. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW: **Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism.** *Annual review of physiology* 2013, **75**:503-533.
42. Go AS: **Cardiovascular Disease Consequences of CKD.** *Seminars in nephrology* 2016, **36**(4):293-304.
43. Civitelli R, Ziambaras K: **Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators.** *Journal of endocrinological investigation* 2011, **34**(7 Suppl):3-7.
44. Chen RA, Goodman WG: **Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology.** *American journal of physiology Renal physiology* 2004, **286**(6):F1005-1011.
45. Potts JT: **Parathyroid hormone: past and present.** *The Journal of endocrinology* 2005, **187**(3):311-325.
46. Johnson JA, Kumar R: **Vitamin D and renal calcium transport.** *Current opinion in nephrology and hypertension* 1994, **3**(4):424-429.
47. Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeney C, Schiavi SC: **Intestinal npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009, **20**(11):2348-2358.
48. Farrow EG, White KE: **Recent advances in renal phosphate handling.** *Nature reviews Nephrology* 2010, **6**(4):207-217.
49. DiGirolamo DJ, Clemens TL, Kousteni S: **The skeleton as an endocrine organ.** *Nature reviews Rheumatology* 2012, **8**(11):674-683.
50. Silver J, Naveh-Many T: **Phosphate and the parathyroid.** *Kidney international* 2009, **75**(9):898-905.
51. Bergwitz C, Jüppner H: **Phosphate sensing.** *Advances in chronic kidney disease* 2011, **18**(2):132-144.
52. Martin KJ, Gonzalez EA: **Metabolic bone disease in chronic kidney disease.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007, **18**(3):875-885.
53. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutierrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellorovich K, Chen J *et al*: **Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease.** *Kidney international* 2011, **79**(12):1370-1378.

54. Moe SM, Drueke T, Lameire N, Eknoyan G: **Chronic kidney disease-mineral-bone disorder: a new paradigm.** *Advances in chronic kidney disease* 2007, **14**(1):3-12.
55. Itoh N, Ornitz DM: **Evolution of the Fgf and Fgfr gene families.** *Trends in genetics : TIG* 2004, **20**(11):563-569.
56. Itoh N, Ornitz DM: **Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease.** *Journal of biochemistry* 2011, **149**(2):121-130.
57. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M: **Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization.** *Molecular cell* 2000, **6**(3):743-750.
58. Ibrahim OA, Yeh BK, Eliseenkova AV, Zhang F, Olsen SK, Igarashi M, Aaronson SA, Linhardt RJ, Mohammadi M: **Analysis of mutations in fibroblast growth factor (FGF) and a pathogenic mutation in FGF receptor (FGFR) provides direct evidence for the symmetric two-end model for FGFR dimerization.** *Molecular and cellular biology* 2005, **25**(2):671-684.
59. Harmer NJ, Pellegrini L, Chirgadze D, Fernandez-Recio J, Blundell TL: **The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity.** *Biochemistry* 2004, **43**(3):629-640.
60. Goetz R, Beenken A, Ibrahim OA, Kalinina J, Olsen SK, Eliseenkova AV, Xu C, Neubert TA, Zhang F, Linhardt RJ *et al*: **Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members.** *Molecular and cellular biology* 2007, **27**(9):3417-3428.
61. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW *et al*: **Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(10):6120-6123.
62. Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Kuro-o M: **BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(18):7432-7437.
63. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E *et al*: **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing.** *Nature* 1997, **390**(6655):45-51.
64. Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu MC, Moe OW, Liang G, Li X, Mohammadi M: **alpha-Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling.** *Nature* 2018, **553**(7689):461-466.
65. Kuro OM: **The Klotho proteins in health and disease.** *Nature reviews Nephrology* 2019, **15**(1):27-44.
66. Kuro OM: **Ageing-related receptors resolved.** *Nature* 2018, **553**(7689):409-410.
67. Lee S, Choi J, Mohanty J, Sousa LP, Tome F, Pardon E, Steyaert J, Lemmon MA, Lax I, Schlessinger J: **Structures of beta-klotho reveal a 'zip code'-like mechanism for endocrine FGF signalling.** *Nature* 2018, **553**(7689):501-505.
68. Lan T, Morgan DA, Rahmouni K, Sonoda J, Fu X, Burgess SC, Holland WL, Klier SA, Mangelsdorf DJ: **FGF19, FGF21, and an FGFR1/beta-Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia.** *Cell metabolism* 2017, **26**(5):709-718.e703.
69. Gaich G, Chien JY, Fu H, Glass LC, Deeg MA, Holland WL, Kharitonov A, Bumol T, Schilke HK, Moller DE: **The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes.** *Cell metabolism* 2013, **18**(3):333-340.

70. Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, Nabeshima YI: **Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein.** *Mechanisms of development* 2000, **98**(1-2):115-119.
71. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-o M: **Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(37):26687-26695.
72. Corsetti G, Pasini E, Scarabelli TM, Romano C, Agrawal PR, Chen-Scarabelli C, Knight R, Saravolatz L, Narula J, Ferrari-Vivaldi M *et al*: **Decreased expression of Klotho in cardiac atria biopsy samples from patients at higher risk of atherosclerotic cardiovascular disease.** *Journal of geriatric cardiology : JGC* 2016, **13**(8):701-711.
73. Kim J-H, Hwang K-H, Park K-S, Kong ID, Cha S-K: **Biological Role of Anti-aging Protein Klotho.** *Journal of lifestyle medicine* 2015, **5**:1-6.
74. Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y: **Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein.** *FEBS letters* 1998, **424**(1-2):6-10.
75. Kraut JA, Madias NE: **Metabolic Acidosis of CKD: An Update.** *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2016, **67**(2):307-317.
76. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR: **Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(50):19796-19801.
77. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y: **Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane.** *FEBS letters* 2004, **565**(1-3):143-147.
78. Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, Kaether C: **Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase.** *FEBS letters* 2009, **583**(19):3221-3224.
79. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N *et al*: **Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(10):8655-8665.
80. Cararo-Lopes MM, Mazucanti CHY, Scavone C, Kawamoto EM, Berwick DC: **The relevance of alpha-KLOTTHO to the central nervous system: Some key questions.** *Ageing research reviews* 2017, **36**:137-148.
81. Xu Y, Sun Z: **Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging.** *Endocrine reviews* 2015, **36**(2):174-193.
82. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y: **Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein.** *Biochemical and biophysical research communications* 1998, **242**(3):626-630.
83. Olejnik A, Franczak A, Krzywonos-Zawadzka A, Kałużna-Oleksy M, Bil-Lula I: **The Biological Role of Klotho Protein in the Development of Cardiovascular Diseases.** *BioMed Research International* 2018, **2018**:5171945.
84. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y: **Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system.** *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2003, **17**(12):2393-2403.
85. Abousaab A, Warsi J, Salker MS, Lang F: **beta-Klotho as a Negative Regulator of the Peptide Transporters PEPT1 and PEPT2.** *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2016, **40**(5):874-882.

86. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J: **The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats.** *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(12):4003-4008.
87. Kuro-o M: **Klotho and the aging process.** *Korean J Intern Med* 2011, **26**(2):113-122.
88. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y: **Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(11):9777-9784.
89. Tan SJ, Smith ER, Holt SG, Hewitson TD, Toussaint ND: **Soluble klotho may be a marker of phosphate reabsorption.** *Clinical kidney journal* 2017, **10**(3):397-404.
90. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ: **Calcium absorption across epithelia.** *Physiological reviews* 2005, **85**(1):373-422.
91. Lee W-S, Hebert SC: **ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. I. Expression in rat distal nephron segments.** *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1995, **268**(6):F1124-F1131.
92. Dong K, Yan Q, Lu M, Wan L, Hu H, Guo J, Boulpaep E, Wang W, Giebisch G, Hebert SC: **Romk1 knockout mice do not produce Bartter phenotype but exhibit impaired K excretion.** *Journal of Biological Chemistry* 2016, **291**(10):5259-5269.
93. Welling PA, Ho K: **A comprehensive guide to the ROMK potassium channel: form and function in health and disease.** *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2009, **297**(4):F849-F863.
94. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M: **Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule.** *The FASEB Journal* 2010, **24**(9):3438-3450.
95. Dalton GD, Xie J, An S-W, Huang C-L: **New insights into the mechanism of action of soluble klotho.** *Frontiers in endocrinology* 2017, **8**:323.
96. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP: **Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho.** *Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**(45):38029-38034.
97. Bartke A: **Long-lived Klotho mice: new insights into the roles of IGF-1 and insulin in aging.** *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2006, **17**(2):33-35.
98. Thurston RD, Larmonier CB, Majewski PM, Ramalingam R, Midura-Kiela M, Laubitz D, Vandewalle A, Besselsen DG, Mühlbauer M, Jobin C: **Downregulation of aging-related Klotho gene in experimental colitis: the role of TNF and IFN- γ .** *Gastroenterology* 2010, **138**(4):1384.
99. Zhang X, Yalcin S, Lee D-F, Yeh T-YJ, Lee S-M, Su J, Mungamuri SK, Rimmelé P, Kennedy M, Sellers R: **FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells.** *Nature cell biology* 2011, **13**(9):1092-1099.
100. Takenaka T, Kobori H, Inoue T, Miyazaki T, Suzuki H, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M: **[op. 4b. 02] klotho supplementation attenuates blood pressure and oxidative stress in diabetes.** *Journal of Hypertension* 2017, **35**:e38.
101. Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Nihei H: **Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line.** *Nephron Experimental Nephrology* 2005, **101**(2):e67-e74.
102. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, Mitobe M, Nishimura S, Shirota S, Akiba T, Nihei H: **Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure.** *Nephrology Dialysis Transplantation* 2005, **20**(12):2636-2645.
103. Oh HJ, Nam BY, Lee MJ, Kim CH, Koo HM, Doh FM, Han JH, Kim EJ, Han JS, Park JT: **Decreased circulating klotho levels in patients undergoing dialysis and relationship to oxidative stress and inflammation.** *Peritoneal Dialysis International* 2015, **35**(1):43-51.

104. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD: **Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2006, **291**(1):E38-E49.
105. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S: **Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism.** *Nature genetics* 2006, **38**(11):1310-1315.
106. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E: **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing.** *Nature* 1997, **390**(6655):45-51.
107. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-o M, Mangelsdorf DJ: **Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse.** *Molecular endocrinology* 2010, **24**(10):2050-2064.
108. Kuro-o M: **Phosphate and klotho.** *Kidney international* 2011, **79**:S20-S23.
109. Murer H, Forster I, Biber J: **The sodium phosphate cotransporter family SLC34.** *Pflügers Archiv* 2004, **447**(5):763-767.
110. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T: **FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis.** *Journal of Bone and Mineral Research* 2004, **19**(3):429-435.
111. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: **Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, **98**(11):6500-6505.
112. Dominguez JR, Shlipak MG, Whooley MA, Ix JH: **Fractional excretion of phosphorus modifies the association between fibroblast growth factor-23 and outcomes.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2013, **24**(4):647-654.
113. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J: **The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats.** *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(12):4003-4008.
114. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD: **Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2006, **17**(5):1305-1315.
115. Meyer MB, Benkusky NA, Kaufmann M, Lee SM, Onal M, Jones G, Pike JW: **A kidney-specific genetic control module in mice governs endocrine regulation of the cytochrome P450 gene Cyp27b1 essential for vitamin D3 activation.** *Journal of Biological Chemistry* 2017, **292**(42):17541-17558.
116. Olauson H, Lindberg K, Amin R, Sato T, Jia T, Goetz R, Mohammadi M, Andersson G, Lanske B, Larsson TE: **Parathyroid-specific deletion of Klotho unravels a novel calcineurin-dependent FGF23 signaling pathway that regulates PTH secretion.** *PLoS genetics* 2013, **9**(12).
117. Liput J, Rose M, Galya C, Chen TC, Puschett JB: **Inhibition by volume expansion of phosphate uptake by the renal proximal tubule brush border membrane.** *Biochemical pharmacology* 1989, **38**(2):321-325.
118. Quinn SJ, Thomsen AR, Pang JL, Kantham L, Bräuner-Osborne H, Pollak M, Goltzman D, Brown EM: **Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2013, **304**(3):E310-E320.
119. Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Muñoz-Castañeda JR, Martinez-Moreno JM, Ramírez AP, Pineda C, Canalejo A, Jaeger P, Aguilera-Tejero E, Rodriguez M: **Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2012, **23**(7):1190-1197.

120. Zhang B, Umbach AT, Chen H, Yan J, Fakhri H, Fajol A, Salker MS, Spichtig D, Daryadel A, Wagner CA: **Up-regulation of FGF23 release by aldosterone.** *Biochemical and biophysical research communications* 2016, **470**(2):384-390.
121. de Seigneux S, Martin P-Y: **Phosphate and FGF23 in the renoprotective benefit of RAAS inhibition.** *Pharmacological research* 2016, **106**:87-91.
122. Lawrence T: **The nuclear factor NF-κB pathway in inflammation.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2009, **1**(6):a001651.
123. David V, Francis C, Babitt JL: **Ironing out the cross talk between FGF23 and inflammation.** *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2017, **312**(1):F1-F8.
124. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y-I: **Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system.** *Molecular endocrinology* 2003, **17**(12):2393-2403.
125. Forster RE, Jurutka PW, Hsieh J-C, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I, Haussler MR, Whitfield GK: **Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells.** *Biochemical and biophysical research communications* 2011, **414**(3):557-562.
126. Tang R, Zhou Q-l, Ao X, Peng W-s, Veeraragoo P, Tang T-f: **Fosinopril and losartan regulate klotho gene and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase expression in kidneys of spontaneously hypertensive rats.** *Kidney and Blood Pressure Research* 2011, **34**(5):350-357.
127. de Borst MH, Vervloet MG, ter Wee PM, Navis G: **Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2011, **22**(9):1603-1609.
128. Marsell R, Krajisnik T, Göransson H, Ohlsson C, Ljunggren Ö, Larsson TE, Jonsson KB: **Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing fibroblast growth factor-23.** *Nephrology Dialysis Transplantation* 2008, **23**(3):827-833.
129. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu M-C, Sloan A, Isakova T, Gutiérrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM: **FGF23 induces left ventricular hypertrophy.** *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**(11).
130. Hu MC, Shi M, Cho HJ, Adams-Huet B, Paek J, Hill K, Shelton J, Amaral AP, Faul C, Taniguchi M: **Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2015, **26**(6):1290-1302.
131. Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M: **Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia.** *The Journal of clinical investigation* 1999, **104**(3):229-237.
132. Suga T, Kurabayashi M, Sando Y, Ohyama Y, Maeno T, Maeno Y, Aizawa H, Matsumura Y, Kuwaki T, Kuro-o M: **Disruption of the klotho gene causes pulmonary emphysema in mice: defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000, **22**(1):26-33.
133. Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N: **Expression of Klotho protein in the inner ear.** *Hearing research* 2002, **171**(1-2):103-110.
134. Nagai T, Yamada K, Kim H-C, Kim Y-S, Noda Y, Imura A, Nabeshima Y-i, Nabeshima T: **Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress.** *The FASEB Journal* 2003, **17**(1):50-52.
135. Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, Quarles LD: **Role of hyperphosphatemia and 1, 25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2007, **18**(7):2116-2124.
136. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T: **Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23**

- in phosphate and vitamin D metabolism.** *The Journal of clinical investigation* 2004, **113**(4):561-568.
137. Kuro-o M: **A potential link between phosphate and aging—lessons from Klotho-deficient mice.** *Mechanisms of ageing and development* 2010, **131**(4):270-275.
 138. Stenvinkel P, Painer J, Kuro-o M, Lanaspá M, Arnold W, Ruf T, Shiels PG, Johnson RJ: **Novel treatment strategies for chronic kidney disease: insights from the animal kingdom.** *Nature Reviews Nephrology* 2018, **14**(4):265.
 139. Stenvinkel P, Larsson TE: **Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging.** *American Journal of Kidney Diseases* 2013, **62**(2):339-351.
 140. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzinger J, Yamamoto K, Renné T, Jahnen-Dechent W: **Structural basis of calcification inhibition by α 2-HS glycoprotein/fetuin-A formation of colloidal calciprotein particles.** *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**(15):13333-13341.
 141. Heiss A, Jahnen-Dechent W, Endo H, Schwahn D: **Structural dynamics of a colloidal protein-mineral complex bestowing on calcium phosphate a high solubility in biological fluids.** *Biointerphases* 2007, **2**(1):16-20.
 142. Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Harada N, Isshiki M, Sato M, Nashiki K, Amo K, Yamamoto H, Higashi Y *et al*: **Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009, **20**(7):1504-1512.
 143. Yamada H, Kuro OM, Ishikawa SE, Funazaki S, Kusaka I, Kakei M, Hara K: **Daily variability in serum levels of calciprotein particles and their association with mineral metabolism parameters: A cross-sectional pilot study.** *Nephrology (Carlton, Vic)* 2018, **23**(3):226-230.
 144. Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, Holt SG: **Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage.** *PLoS one* 2013, **8**(4):e60904.
 145. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D, Pavenstadt H: **Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro.** *American journal of physiology Renal physiology* 2008, **294**(6):F1381-1387.
 146. Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, Neumann M, Shanahan CM, Proudfoot D: **Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization.** *Circulation research* 2008, **103**(5):e28-34.
 147. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL: **Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro.** *Kidney international* 2011, **79**(4):414-422.
 148. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM: **Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004, **15**(11):2857-2867.
 149. Villa-Bellosta R, Sorribas V: **Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009, **29**(5):761-766.
 150. Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, Nakamura T, Aihara Y, Kaname T, Suga T, Arai M, Aizawa H, Matsumura Y *et al*: **Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress.** *Biochemical and biophysical research communications* 1998, **251**(3):920-925.
 151. Kuro-o M: **Klotho and endocrine fibroblast growth factors: markers of chronic kidney disease progression and cardiovascular complications?** *Nephrology Dialysis Transplantation* 2018, **34**(1):15-21.

152. Miura Y, Iwazu Y, Shiizaki K, Akimoto T, Kotani K, Kurabayashi M, Kurosu H, Kuro OM: **Identification and quantification of plasma calciprotein particles with distinct physical properties in patients with chronic kidney disease.** *Scientific reports* 2018, **8**(1):1256.
153. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rajkumar C, McMahon LP, Holt SG: **Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD.** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012, **27**(5):1957-1966.
154. Hamano T, Matsui I, Mikami S, Tomida K, Fujii N, Imai E, Rakugi H, Isaka Y: **Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010, **21**(11):1998-2007.
155. Hamano K, Nitta A, Ohtake T, Kobayashi S: **Associations of renal vascular resistance with albuminuria and other macroangiopathy in type 2 diabetic patients.** *Diabetes care* 2008, **31**(9):1853-1857.
156. Cai MM, Smith ER, Brumby C, McMahon LP, Holt SG: **Fetuin-A-containing calciprotein particle levels can be reduced by dialysis, sodium thiosulphate and plasma exchange. Potential therapeutic implications for calciphylaxis?** *Nephrology (Carlton, Vic)* 2013, **18**(11):724-727.
157. Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R *et al*: **Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice.** *Nature communications* 2014, **2**:4172.
158. Custodero C, Mankowski RT, Lee SA, Chen Z, Wu S, Manini TM, Hincapie Echeverri J, Sabba C, Beavers DP, Cauley JA *et al*: **Evidence-based nutritional and pharmacological interventions targeting chronic low-grade inflammation in middle-age and older adults: A systematic review and meta-analysis.** *Ageing research reviews* 2018, **46**:42-59.
159. Stenvinkel P, Painer J, Kuro OM, Lanaspa M, Arnold W, Ruf T, Shiels PG, Johnson RJ: **Novel treatment strategies for chronic kidney disease: insights from the animal kingdom.** *Nature reviews Nephrology* 2018, **14**(4):265-284.
160. Kuro OM, Moe OW: **FGF23-alphaKlotho as a paradigm for a kidney-bone network.** *Bone* 2017, **100**:4-18.
161. Haut LL, Alfrey AC, Guggenheim S, Buddington B, Schrier N: **Renal toxicity of phosphate in rats.** *Kidney international* 1980, **17**(6):722-731.
162. Denic A, Lieske JC, Chakkerla HA, Poggio ED, Alexander MP, Singh P, Kremers WK, Lerman LO, Rule AD: **The Substantial Loss of Nephrons in Healthy Human Kidneys with Aging.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2017, **28**(1):313-320.
163. Young A, Hodsman AB, Boudville N, Geddes C, Gill J, Goltzman D, Jassal SV, Klarenbach S, Knoll G, Muirhead N *et al*: **Bone and mineral metabolism and fibroblast growth factor 23 levels after kidney donation.** *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2012, **59**(6):761-769.
164. Westerberg PA, Ljunggren O, Larsson TE, Wadstrom J, Linde T: **Fibroblast growth factor-23 and mineral metabolism after unilateral nephrectomy.** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2010, **25**(12):4068-4071.
165. Patterson R, McNamara E, Tainio M, de Sa TH, Smith AD, Sharp SJ, Edwards P, Woodcock J, Brage S, Wijndaele K: **Sedentary behaviour and risk of all-cause, cardiovascular and cancer mortality, and incident type 2 diabetes: a systematic review and dose response meta-analysis.** *European journal of epidemiology* 2018, **33**(9):811-829.

166. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM, Ferrucci L: **Plasma klotho and cardiovascular disease in adults.** *Journal of the American Geriatrics Society* 2011, **59**(9):1596-1601.
167. Keles N, Caliskan M, Dogan B, Keles NN, Kalcik M, Aksu F, Kostek O, Aung SM, Isbilen B, Oguz A: **Low Serum Level of Klotho Is an Early Predictor of Atherosclerosis.** *The Tohoku journal of experimental medicine* 2015, **237**(1):17-23.
168. Song S, Gao P, Xiao H, Xu Y, Si LY: **Klotho suppresses cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury via downregulation of endoplasmic reticulum stress.** *PloS one* 2013, **8**(12):e82968.
169. Song S, Si LY: **Klotho ameliorated isoproterenol-induced pathological changes in cardiomyocytes via the regulation of oxidative stress.** *Life sciences* 2015, **135**:118-123.
170. Xie J, Cha SK, An SW, Kuro OM, Birnbaumer L, Huang CL: **Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart.** *Nature communications* 2012, **3**:1238.
171. Wu X, Eder P, Chang B, Molkentin JD: **TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(15):7000-7005.
172. Bush EW, Hood DB, Papst PJ, Chapo JA, Minobe W, Bristow MR, Olson EN, McKinsey TA: **Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(44):33487-33496.
173. Sabourin J, Robin E, Raddatz E: **A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart.** *Cardiovascular research* 2011, **92**(2):226-236.
174. Yang K, Wang C, Nie L, Zhao X, Gu J, Guan X, Wang S, Xiao T, Xu X, He T *et al*: **Klotho Protects Against Indoxyl Sulphate-Induced Myocardial Hypertrophy.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(10):2434-2446.
175. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA: **Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients.** *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2009, **4**(10):1551-1558.
176. Paula RS, Souza VC, Machado-Silva W, Almeida BR, Daros AC, Gomes L, Ferreira AP, Brito CJ, Cordova C, Moraes CF *et al*: **Serum Klotho (but not haplotypes) associate with the post-myocardial infarction status of older adults.** *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 2016, **71**(12):725-732.
177. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW: **Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011, **22**(1):124-136.
178. Zhao Y, Banerjee S, Dey N, LeJeune WS, Sarkar PS, Brobey R, Rosenblatt KP, Tilton RG, Choudhary S: **Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation.** *Diabetes* 2011, **60**(7):1907-1916.
179. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A *et al*: **Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes.** *Kidney international* 2007, **72**(3):247-259.
180. White KE, Evans WE, O'Riordan JL, Speer MC, Econs MJ, Lorenz-Depiereux B, Grabowski M, Meitinger T, Strom TM: **Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23.** *Nature genetics* 2000, **26**(3):345-348.

181. Kurosu H, Kuro-o M: **Endocrine fibroblast growth factors as regulators of metabolic homeostasis.** *Biofactors* 2009, **35**(1):52-60.
182. Yu X, White KE: **FGF23 and disorders of phosphate homeostasis.** *Cytokine & growth factor reviews* 2005, **16**(2):221-232.
183. Garringer HJ, Fisher C, Larsson TE, Davis SI, Koller DL, Cullen MJ, Draman MS, Conlon N, Jain A, Fedarko NS: **The role of mutant UDP-N-acetyl- α -d-galactosamine-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in regulating serum intact fibroblast growth factor 23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein in heritable tumoral calcinosis.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006, **91**(10):4037-4042.
184. Kato K, Jeanneau C, Tarp MA, Benet-Pagès A, Lorenz-Depiereux B, Bennett EP, Mandel U, Strom TM, Clausen H: **Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(27):18370-18377.
185. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, Goetz R, Mohammadi M, White KE, Econs MJ: **A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis.** *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(9):2684-2691.
186. Brownstein CA, Adler F, Nelson-Williams C, Iijima J, Li P, Imura A, Nabeshima Y-i, Reyes-Mugica M, Carpenter TO, Lifton RP: **A translocation causing increased α -Klotho level results in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, **105**(9):3455-3460.
187. Smith RC, O'Bryan LM, Farrow EG, Summers LJ, Clinkenbeard EL, Roberts JL, Cass TA, Saha J, Broderick C, Ma YL: **Circulating α Klotho influences phosphate handling by controlling FGF23 production.** *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(12):4710-4715.
188. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Levey AS: **Prevalence of chronic kidney disease in the United States.** *Jama* 2007, **298**(17):2038-2047.
189. Denic A, Lieske JC, Chakkera HA, Poggio ED, Alexander MP, Singh P, Kremers WK, Lerman LO, Rule AD: **The substantial loss of nephrons in healthy human kidneys with aging.** *Journal of the American Society of Nephrology* 2017, **28**(1):313-320.
190. Bacchetta J, Dubourg L, Harambat J, Ranchin B, Abou-Jaoude P, Arnaud S, Carlier M-C, Richard M, Cochat P: **The influence of glomerular filtration rate and age on fibroblast growth factor 23 serum levels in pediatric chronic kidney disease.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010, **95**(4):1741-1748.
191. Hasegawa H, Nagano N, Urakawa I, Yamazaki Y, Iijima K, Fujita T, Yamashita T, Fukumoto S, Shimada T: **Direct evidence for a causative role of FGF23 in the abnormal renal phosphate handling and vitamin D metabolism in rats with early-stage chronic kidney disease.** *Kidney international* 2010, **78**(10):975-980.
192. MacKay EM, Oliver J: **Renal damage following the ingestion of a diet containing an excess of inorganic phosphate.** *Journal of Experimental Medicine* 1935, **61**(3):319-334.
193. Haut LL, Alfrey AC, Guggenheim S, Buddington B, Schrier N: **Renal toxicity of phosphate in rats.** *Kidney international* 1980, **17**(6):722-731.
194. Kuro OM: **The FGF23 and Klotho system beyond mineral metabolism.** *Clinical and experimental nephrology* 2017, **21**(Suppl 1):64-69.
195. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, Singh S, Sloan A, Yanucil C, Li J, Shehadeh LA, Hare JM, David V *et al*: **Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy.** *Cell metabolism* 2015, **22**(6):1020-1032.
196. Kiel DP, Kauppila LI, Cupples LA, Hannan MT, O'Donnell CJ, Wilson PW: **Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study.** *Calcified tissue international* 2001, **68**(5):271-276.

197. Kavousi M, Desai CS, Ayers C, Blumenthal RS, Budoff MJ, Mahabadi AA, Ikram MA, van der Lugt A, Hofman A, Erbel R *et al*: **Prevalence and Prognostic Implications of Coronary Artery Calcification in Low-Risk Women: A Meta-analysis.** *Jama* 2016, **316**(20):2126-2134.
198. **GRCh38: Ensembl release 89: ENSG00000133116** [[https://en.wikipedia.org/wiki/Klotho_\(biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Klotho_(biology))]
199. Li SA, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K: **Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice.** *Cell structure and function* 2004, **29**(4):91-99.
200. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE: **Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II.** *Clinical pharmacokinetics* 2010, **49**(4):207-221.
201. Majumdar V, Nagaraja D, Christopher R: **Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke.** *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **403**(3-4):412-416.
202. Arking DE, Krebsova A, Macek M, Sr., Macek M, Jr., Arking A, Mian IS, Fried L, Hamosh A, Dey S, McIntosh I *et al*: **Association of human aging with a functional variant of klotho.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(2):856-861.
203. Deary IJ, Harris SE, Fox HC, Hayward C, Wright AF, Starr JM, Whalley LJ: **KLOTHO genotype and cognitive ability in childhood and old age in the same individuals.** *Neuroscience letters* 2005, **378**(1):22-27.
204. Mengel-From J, Soerensen M, Nygaard M, McGue M, Christensen K, Christiansen L: **Genetic Variants in KLOTHO Associate With Cognitive Function in the Oldest Old Group.** *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2016, **71**(9):1151-1159.
205. Marchelek-Mysliwiec M, Rozanski J, Ogradowczyk A, Dutkiewicz G, Dolegowska B, Salata D, Budkowska M, Safranow K, Stepniewska J, Wisniewska M *et al*: **The association of the Klotho polymorphism rs9536314 with parameters of calcium-phosphate metabolism in patients on long-term hemodialysis.** *Renal failure* 2016, **38**(5):776-780.
206. Arking DE, Becker DM, Yanek LR, Fallin D, Judge DP, Moy TF, Becker LC, Dietz HC: **KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease.** *American journal of human genetics* 2003, **72**(5):1154-1161.
207. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC: **Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity.** *Circulation research* 2005, **96**(4):412-418.
208. Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Horio T, Hanada H, Ohishi M, Katsuya T, Okamura T *et al*: **Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension.** *Geriatrics & gerontology international* 2010, **10**(4):311-318.
209. Kawano K, Kawaguchi H: **[Human klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women].** *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 2004, **62 Suppl 2**:190-194.
210. Imamura A, Okumura K, Ogawa Y, Murakami R, Torigoe M, Numaguchi Y, Murohara T: **Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary artery disease but not for vasospastic angina in Japanese.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2006, **371**(1-2):66-70.
211. Hao Q, Ding X, Gao L, Yang M, Dong B: **G-395A polymorphism in the promoter region of the KLOTHO gene associates with reduced cognitive impairment among the oldest old.** *Age (Dordrecht, Netherlands)* 2016, **38**(1):7.

212. Rhee EJ, Oh KW, Yun EJ, Jung CH, Lee WY, Kim SW, Baek KH, Kang MI, Park SW: **Relationship between polymorphisms G395A in promoter and C1818T in exon 4 of the KLOTHO gene with glucose metabolism and cardiovascular risk factors in Korean women.** *Journal of endocrinological investigation* 2006, **29**(7):613-618.
213. Elghoroury EA, Fadel FI, Elshamaa MF, Kandil D, Salah DM, El-Sonbaty MM, Farouk H, Raafat M, Nasr S: **Klotho G-395A gene polymorphism: impact on progression of end-stage renal disease and development of cardiovascular complications in children on dialysis.** *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2018, **33**(6):1019-1027.
214. Ko GJ, Lee YM, Lee EA, Lee JE, Bae SY, Park SW, Park MS, Pyo HJ, Kwon YJ: **The association of Klotho gene polymorphism with the mortality of patients on maintenance dialysis.** *Clinical nephrology* 2013, **80**(4):263-269.
215. Hu MC, Shi M, Gillings N, Flores B, Takahashi M, Kuro OM, Moe OW: **Recombinant alpha-Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy.** *Kidney international* 2017, **91**(5):1104-1114.
216. Mogelvang R, Biering-Sorensen T, Jensen JS: **Tissue Doppler echocardiography predicts acute myocardial infarction, heart failure, and cardiovascular death in the general population.** *European heart journal cardiovascular Imaging* 2015, **16**(12):1331-1337.
217. Turpeinen U, Hohenthal U, Stenman UH: **Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay.** *Clinical chemistry* 2003, **49**(9):1521-1524.
218. Shimoyama Y, Nishio K, Hamajima N, Niwa T: **KLOTHO gene polymorphisms G-395A and C1818T are associated with lipid and glucose metabolism, bone mineral density and systolic blood pressure in Japanese healthy subjects.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2009, **406**(1-2):134-138.
219. **Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of, Cardiovascular Imaging.** *European heart journal cardiovascular Imaging* 2016, **17**(4):412.
220. Utsunomiya H, Yamamoto H, Urabe Y, Tsushima H, Kunita E, Kitagawa T, Hidaka T, Kihara Y: **Association between heart calcification assessed by echocardiography and future cardiovascular disease mortality and morbidity.** *International journal of cardiology Heart & vessels* 2013, **2**:15-20.
221. Rotondi S, Pasquali M, Tartaglione L, Muci ML, Mandanici G, Leonangeli C, Sales S, Farcomeni A, Mazzaferro S: **Soluble alpha -Klotho Serum Levels in Chronic Kidney Disease.** *International journal of endocrinology* 2015, **2015**:872193.
222. McDonald SP, Craig JC: **Long-term survival of children with end-stage renal disease.** *The New England journal of medicine* 2004, **350**(26):2654-2662.
223. Karsli Ceppioglu S, Yurdun T, Canbakan M: **Assessment of matrix Gla protein, Klotho gene polymorphisms, and oxidative stress in chronic kidney disease.** *Renal failure* 2011, **33**(9):866-874.
224. Ignjatović AM, Cvetković TP, Pavlović RM, Đorđević VM, Milošević ZG, Đorđević VB, Pavlović DD, Stojanović IR, Bogdanović D: **Endothelial dysfunction, inflammation and malnutrition markers as predictors of mortality in dialysis patients: multimarker approach.** *International urology and nephrology* 2013, **45**(6):1715-1724.
225. Murer H, Forster I, Biber J: **The sodium phosphate cotransporter family SLC34.** *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2004, **447**(5):763-767.
226. Chonchol M, Greene T, Zhang Y, Hoofnagle AN, Cheung AK: **Low Vitamin D and High Fibroblast Growth Factor 23 Serum Levels Associate with Infectious and Cardiac Deaths in the HEMO Study.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2016, **27**(1):227-237.

227. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T: **FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2004, **19**(3):429-435.
228. Hesse M, Frohlich LF, Zeitz U, Lanske B, Erben RG: **Ablation of vitamin D signaling rescues bone, mineral, and glucose homeostasis in Fgf-23 deficient mice.** *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2007, **26**(2):75-84.
229. Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B: **Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006, **20**(6):720-722.
230. Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, Quarles LD: **Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007, **18**(7):2116-2124.
231. Ohnishi M, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS: **In vivo genetic evidence for suppressing vascular and soft-tissue calcification through the reduction of serum phosphate levels, even in the presence of high serum calcium and 1,25-dihydroxyvitamin d levels.** *Circulation Cardiovascular genetics* 2009, **2**(6):583-590.
232. Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Kagawa T, Inoue M, Fujimoto S, Ikebe M, Yuasa K *et al*: **Serum levels of soluble secreted alpha-Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis.** *Clinical and experimental nephrology* 2012, **16**(5):722-729.
233. Jamal SA, Vandermeer B, Raggi P, Mendelssohn DC, Chatterley T, Dorgan M, Lok CE, Fitchett D, Tsuyuki RT: **Effect of calcium-based versus non-calcium-based phosphate binders on mortality in patients with chronic kidney disease: an updated systematic review and meta-analysis.** *Lancet (London, England)* 2013, **382**(9900):1268-1277.
234. Stenvinkel P, Larsson TE: **Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging.** *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2013, **62**(2):339-351.
235. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM: **Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification.** *Circulation research* 2000, **87**(7):E10-17.
236. Li X, Yang HY, Giachelli CM: **Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification.** *Circulation research* 2006, **98**(7):905-912.
237. Chavkin NW, Chia JJ, Crouthamel MH, Giachelli CM: **Phosphate uptake-independent signaling functions of the type III sodium-dependent phosphate transporter, PiT-1, in vascular smooth muscle cells.** *Experimental cell research* 2015, **333**(1):39-48.
238. Kuro-o M: **Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism.** *Nature reviews Nephrology* 2013, **9**(11):650-660.
239. Druke TB, Massy ZA: **Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease.** *Kidney international* 2016, **89**(2):289-302.
240. Zhou X, Chen K, Lei H, Sun Z: **Klotho gene deficiency causes salt-sensitive hypertension via monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine receptor 2-mediated inflammation.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(1):121-132.
241. **Journal club. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate.** *Kidney international* 2011, **80**(12):1250-1251.
242. Laouari D, Friedlander G, Burtin M, Silve C, Dechaux M, Garabedian M, Kleinknecht C: **Subtotal nephrectomy alters tubular function: effect of phosphorus restriction.** *Kidney international* 1997, **52**(6):1550-1560.

243. Wang M, Kim SH, Monticone RE, Lakatta EG: **Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis.** *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2015, **65**(4):698-703.
244. Block GA, Spiegel DM, Ehrlich J, Mehta R, Lindbergh J, Dreisbach A, Raggi P: **Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis.** *Kidney international* 2005, **68**(4):1815-1824.
245. Suki WN: **Effects of sevelamer and calcium-based phosphate binders on mortality in hemodialysis patients: results of a randomized clinical trial.** *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 2008, **18**(1):91-98.
246. McGovern AP, de Lusignan S, van Vlymen J, Liyanage H, Tomson CR, Gallagher H, Rafiq M, Jones S: **Serum phosphate as a risk factor for cardiovascular events in people with and without chronic kidney disease: a large community based cohort study.** *PloS one* 2013, **8**(9):e74996.
247. Yoon CY, Park JT, Jhee JH, Noh J, Kee YK, Seo C, Lee M, Cha MU, Kim H, Park S *et al*: **High dietary phosphorus density is a risk factor for incident chronic kidney disease development in diabetic subjects: a community-based prospective cohort study.** *The American journal of clinical nutrition* 2017, **106**(1):311-321.
248. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G: **Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease.** *Circulation* 2005, **112**(17):2627-2633.
249. Chang AR, Lazo M, Appel LJ, Gutierrez OM, Grams ME: **High dietary phosphorus intake is associated with all-cause mortality: results from NHANES III.** *The American journal of clinical nutrition* 2014, **99**(2):320-327.
250. Palomino HL, Rifkin DE, Anderson C, Criqui MH, Whooley MA, Ix JH: **24-hour urine phosphorus excretion and mortality and cardiovascular events.** *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2013, **8**(7):1202-1210.
251. Rufino M, de Bonis E, Martin M, Rebollo S, Martin B, Miquel R, Cobo M, Hernandez D, Torres A, Lorenzo V: **Is it possible to control hyperphosphataemia with diet, without inducing protein malnutrition?** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1998, **13 Suppl 3**:65-67.
252. Hill KM, Martin BR, Wastney ME, McCabe GP, Moe SM, Weaver CM, Peacock M: **Oral calcium carbonate affects calcium but not phosphorus balance in stage 3-4 chronic kidney disease.** *Kidney international* 2013, **83**(5):959-966.
253. Wu M, Rementer C, Giachelli CM: **Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment.** *Calcified tissue international* 2013, **93**(4):365-373.
254. Gutierrez OM, Anderson C, Isakova T, Scialla J, Negrea L, Anderson AH, Bellovich K, Chen J, Robinson N, Ojo A *et al*: **Low socioeconomic status associates with higher serum phosphate irrespective of race.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010, **21**(11):1953-1960.
255. Sullivan C, Sayre SS, Leon JB, Machekano R, Love TE, Porter D, Marbury M, Sehgal AR: **Effect of food additives on hyperphosphatemia among patients with end-stage renal disease: a randomized controlled trial.** *Jama* 2009, **301**(6):629-635.
256. Karavetian M, de Vries N, Elzein H, Rizk R, Bechwaty F: **Effect of behavioral stage-based nutrition education on management of osteodystrophy among hemodialysis patients, Lebanon.** *Patient education and counseling* 2015, **98**(9):1116-1122.
257. Lou LM, Caverni A, Gimeno JA, Moreno R, Perez J, Alvarez R, Campos B, Garcia M, Gutierrez A, Bielsa S *et al*: **Dietary intervention focused on phosphate intake in hemodialysis patients with hyperphosphoremia.** *Clinical nephrology* 2012, **77**(6):476-483.

258. Uribarri J: **Phosphorus homeostasis in normal health and in chronic kidney disease patients with special emphasis on dietary phosphorus intake.** *Seminars in dialysis* 2007, **20**(4):295-301.
259. Zeng QY, Xia ZY, Tong YS, Sun L, Mou HB, Chen R, Bi GY, Liu CH: **Association of klotho gene polymorphism and the regulation of calcium-phosphate metabolism disorders in patients with end-stage renal disease.** *Nephrology (Carlton, Vic)* 2019, **24**(10):1001-1008.
260. Wang HL, Xu Q, Wang Z, Zhang YH, Si LY, Li XJ, Yang QH, Xiao H: **A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2010, **411**(5-6):386-390.
261. Ko GJ, Lee EA, Jeon US, Pyo HJ, Chin HJ, Chae DW, Kim S, Kwon YJ: **The association of Klotho polymorphism with disease progression and mortality in IgA nephropathy.** *Kidney & blood pressure research* 2012, **36**(1):191-199.
262. Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, Yoshida S, Shiohira S, Nitta K, Tsuchiya K: **Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70.** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2010, **25**(1):60-68.
263. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira, II, Schimel D, Kuo CJ *et al*: **Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging.** *Science (New York, NY)* 2007, **317**(5839):803-806.
264. Li L, Wang Y, Gao W, Yuan C, Zhang S, Zhou H, Huang M, Yao X: **Klotho Reduction in Alveolar Macrophages Contributes to Cigarette Smoke Extract-induced Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** *The Journal of biological chemistry* 2015, **290**(46):27890-27900.
265. Rhee EJ, Oh KW, Lee WY, Kim SY, Jung CH, Kim BJ, Sung KC, Kim BS, Kang JH, Lee MH *et al*: **The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease.** *Metabolism: clinical and experimental* 2006, **55**(10):1344-1351.
266. Tsezou A, Furuichi T, Satra M, Makrythanasis P, Ikegawa S, Malizos KN: **Association of KLOTHO gene polymorphisms with knee osteoarthritis in Greek population.** *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2008, **26**(11):1466-1470.
267. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK: **Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study.** *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1998, **31**(4):607-617.
268. Nicoll R, Henein M: **Arterial calcification: A new perspective?** *International journal of cardiology* 2017, **228**:11-22.
269. Lee CD, Jacobs DR, Jr., Hankinson A, Iribarren C, Sidney S: **Cardiorespiratory fitness and coronary artery calcification in young adults: The CARDIA Study.** *Atherosclerosis* 2009, **203**(1):263-268.
270. Chen J, Budoff MJ, Reilly MP, Yang W, Rosas SE, Rahman M, Zhang X, Roy JA, Lustigova E, Nessel L *et al*: **Coronary Artery Calcification and Risk of Cardiovascular Disease and Death Among Patients With Chronic Kidney Disease.** *JAMA cardiology* 2017, **2**(6):635-643.
271. Datta SK, Kumar V, Ahmed RS, Tripathi AK, Kalra OP, Banerjee BD: **Effect of GSTM1 and GSTT1 double deletions in the development of oxidative stress in diabetic nephropathy patients.** *Indian journal of biochemistry & biophysics* 2010, **47**(2):100-103.
272. Faul C, Amaral AP, Oskoueï B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, Gutierrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM *et al*: **FGF23 induces left ventricular hypertrophy.** *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**(11):4393-4408.

273. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, Barre PE: **Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy.** *Kidney international* 1995, **47**(1):186-192.
274. Levin A, Thompson CR, Ethier J, Carlisle EJ, Tobe S, Mendelssohn D, Burgess E, Jindal K, Barrett B, Singer J *et al*: **Left ventricular mass index increase in early renal disease: impact of decline in hemoglobin.** *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1999, **34**(1):125-134.
275. Dimitrijevic ZM, Salinger Martinovic SS, Nikolic VN, Cvetkovic TP: **Protein Carbonyl Content Is a Predictive Biomarker of Eccentric Left Ventricular Hypertrophy in Hemodialysis Patients.** *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 2019, **9**(4).
276. Agarwal I, Ide N, Ix JH, Kestenbaum B, Lanske B, Schiller NB, Whooley MA, Mukamal KJ: **Fibroblast growth factor-23 and cardiac structure and function.** *Journal of the American Heart Association* 2014, **3**(1):e000584.
277. Yu L, Meng W, Ding J, Cheng M: **Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through suppression of the AT1R/beta catenin pathway.** *Biochemical and biophysical research communications* 2016, **473**(2):455-461.
278. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, Lee JK, Kamiya K, Kitaichi K, Yamamoto K *et al*: **Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression.** *Circulation* 2004, **109**(14):1776-1782.
279. Brandenburg VM, Kleber ME, Vervloet MG, Larsson TE, Tomaschitz A, Pilz S, Stojakovic T, Delgado G, Grammer TB, Marx N *et al*: **Soluble klotho and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study.** *Atherosclerosis* 2015, **242**(2):483-489.
280. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y *et al*: **Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects.** *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **398**(3):513-518.
281. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM, Ferrucci L: **Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults.** *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2011, **66**(7):794-800.
282. Liu X, Chen Y, McCoy CW, Zhao T, Quarles DL, Pi M, Bhattacharya SK, King G, Sun Y: **Differential Regulatory Role of Soluble Klothos on Cardiac Fibrogenesis in Hypertension.** *American journal of hypertension* 2016, **29**(10):1140-1147.
283. Weber KT: **Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts.** *J Hypertens* 2004, **22**(1):47-50.
284. van den Borne SW, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J: **Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts.** *Nature reviews Cardiology* 2010, **7**(1):30-37.
285. Shalhoub V, Ward SC, Sun B, Stevens J, Renshaw L, Hawkins N, Richards WG: **Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and alpha-klotho stimulate osteoblastic MC3T3.E1 cell proliferation and inhibit mineralization.** *Calcified tissue international* 2011, **89**(2):140-150.
286. Medici D, Razaque MS, Deluca S, Rector TL, Hou B, Kang K, Goetz R, Mohammadi M, Kuro OM, Olsen BR *et al*: **FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis.** *The Journal of cell biology* 2008, **182**(3):459-465.
287. Lin Y, Sun Z: **Antiaging gene Klotho enhances glucose-induced insulin secretion by up-regulating plasma membrane levels of TRPV2 in MIN6 beta-cells.** *Endocrinology* 2012, **153**(7):3029-3039.
288. Lin Y, Sun Z: **In vivo pancreatic beta-cell-specific expression of antiaging gene Klotho: a novel approach for preserving beta-cells in type 2 diabetes.** *Diabetes* 2015, **64**(4):1444-1458.

289. Fan J, Sun Z: **The Antiaging Gene Klotho Regulates Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2016, **34**(6):1615-1625.
290. Mathew JS, Sachs MC, Katz R, Patton KK, Heckbert SR, Hoofnagle AN, Alonso A, Chonchol M, Deo R, Ix JH *et al*: **Fibroblast growth factor-23 and incident atrial fibrillation: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and the Cardiovascular Health Study (CHS).** *Circulation* 2014, **130**(4):298-307.
291. Seiler S, Cremers B, Rebling NM, Hornof F, Jeken J, Kersting S, Steimle C, Ege P, Fehrenz M, Rogacev KS *et al*: **The phosphatonin fibroblast growth factor 23 links calcium-phosphate metabolism with left-ventricular dysfunction and atrial fibrillation.** *European heart journal* 2011, **32**(21):2688-2696.
292. Touchberry CD, Green TM, Tchikrizov V, Mannix JE, Mao TF, Carney BW, Girgis M, Vincent RJ, Wetmore LA, Dawn B *et al*: **FGF23 is a novel regulator of intracellular calcium and cardiac contractility in addition to cardiac hypertrophy.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2013, **304**(8):E863-873.
293. Tripepi G, Kollerits B, Leonardis D, Yilmaz MI, Postorino M, Fliser D, Mallamaci F, Kronenberg F, Zoccali C: **Competitive interaction between fibroblast growth factor 23 and asymmetric dimethylarginine in patients with CKD.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(4):935-944.
294. Mirza MA, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE: **Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population.** *Atherosclerosis* 2009, **207**(2):546-551.
295. Jovanovich A, Ix JH, Gottdiener J, McFann K, Katz R, Kestenbaum B, de Boer IH, Sarnak M, Shlipak MG, Mukamal KJ *et al*: **Fibroblast growth factor 23, left ventricular mass, and left ventricular hypertrophy in community-dwelling older adults.** *Atherosclerosis* 2013, **231**(1):114-119.
296. Ix JH, Katz R, Kestenbaum BR, de Boer IH, Chonchol M, Mukamal KJ, Rifkin D, Siscovick DS, Sarnak MJ, Shlipak MG: **Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study).** *Journal of the American College of Cardiology* 2012, **60**(3):200-207.
297. Plischke M, Neuhold S, Adlbrecht C, Bielez B, Shayganfar S, Bieglmayer C, Szekeres T, Horl WH, Strunk G, Vavken P *et al*: **Inorganic phosphate and FGF-23 predict outcome in stable systolic heart failure.** *European journal of clinical investigation* 2012, **42**(6):649-656.
298. Taylor EN, Rimm EB, Stampfer MJ, Curhan GC: **Plasma fibroblast growth factor 23, parathyroid hormone, phosphorus, and risk of coronary heart disease.** *American heart journal* 2011, **161**(5):956-962.
299. Reindl M, Reinstadler SJ, Feistritzer HJ, Mueller L, Koch C, Mayr A, Theurl M, Kirchmair R, Klug G, Metzler B: **Fibroblast growth factor 23 as novel biomarker for early risk stratification after ST-elevation myocardial infarction.** *Heart (British Cardiac Society)* 2017, **103**(11):856-862.
300. Richter M, Lautze HJ, Walther T, Braun T, Kostin S, Kubin T: **The failing heart is a major source of circulating FGF23 via oncostatin M receptor activation.** *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2015, **34**(9):1211-1214.
301. Andrukhova O, Slavic S, Odorfer KI, Erben RG: **Experimental Myocardial Infarction Upregulates Circulating Fibroblast Growth Factor-23.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2015, **30**(10):1831-1839.
302. Faul C: **Cardiac actions of fibroblast growth factor 23.** *Bone* 2017, **100**:69-79.
303. Drechsler C, Pilz S, Obermayer-Pietsch B, Verduijn M, Tomaschitz A, Krane V, Espe K, Dekker F, Brandenburg V, Marz W *et al*: **Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death,**

- combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. *European heart journal* 2010, **31**(18):2253-2261.
304. Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Hong TT, Zhang Y, Yeghiazarians Y, Gardner DG: **Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy.** *Circulation* 2011, **124**(17):1838-1847.
305. Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG, Li YC: **Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2005, **288**(1):E125-132.
306. Goldsmith DJ, Covic A, Sambrook PA, Ackrill P: **Vascular calcification in long-term haemodialysis patients in a single unit: a retrospective analysis.** *Nephron* 1997, **77**(1):37-43.
307. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G: **Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects.** *Physiol Rev* 2016, **96**(1):365-408.
308. Tamayo M, Manzanares E, Bas M, Martin-Nunes L, Val-Blasco A, Jesus Larriba M, Fernandez-Velasco M, Delgado C: **Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) increases L-type calcium current via protein kinase A signaling and modulates calcium cycling and contractility in isolated mouse ventricular myocytes.** *Heart rhythm* 2017, **14**(3):432-439.
309. An BS, Tavera-Mendoza LE, Dimitrov V, Wang X, Calderon MR, Wang HJ, White JH: **Stimulation of Sirt1-regulated FoxO protein function by the ligand-bound vitamin D receptor.** *Molecular and cellular biology* 2010, **30**(20):4890-4900.
310. Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L, Simpson RU: **Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility.** *Endocrinology* 2008, **149**(2):558-564.
311. Holick MF: **Vitamin D deficiency.** *The New England journal of medicine* 2007, **357**(3):266-281.
312. Gotsman I, Shauer A, Zwas DR, Hellman Y, Keren A, Lotan C, Admon D: **Vitamin D deficiency is a predictor of reduced survival in patients with heart failure; vitamin D supplementation improves outcome.** *European journal of heart failure* 2012, **14**(4):357-366.
313. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B: **25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population.** *Archives of internal medicine* 2008, **168**(15):1629-1637.
314. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W: **Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality.** *Archives of internal medicine* 2008, **168**(12):1340-1349.
315. Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, Lappe DL, Muhlestein JB: **Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population.** *The American journal of cardiology* 2010, **106**(7):963-968.
316. Liu LC, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van der Veer E, Belonje AM, Szymanski MK, Sillje HH, van Gilst WH, Jaarsma T, de Boer RA: **Vitamin D status and outcomes in heart failure patients.** *European journal of heart failure* 2011, **13**(6):619-625.
317. Bodyak N, Ayus JC, Achinger S, Shivalingappa V, Ke Q, Chen YS, Rigor DL, Stillman I, Tamez H, Kroeger PE *et al*: **Activated vitamin D attenuates left ventricular abnormalities induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitive animals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(43):16810-16815.
318. Bae S, Yalamarti B, Ke Q, Choudhury S, Yu H, Karumanchi SA, Kroeger P, Thadhani R, Kang PM: **Preventing progression of cardiac hypertrophy and development of heart failure by paricalcitol therapy in rats.** *Cardiovascular research* 2011, **91**(4):632-639.

319. Bae S, Singh SS, Yu H, Lee JY, Cho BR, Kang PM: **Vitamin D signaling pathway plays an important role in the development of heart failure after myocardial infarction.** *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 2013, **114**(8):979-987.
320. Apostolović B, Cvetković T, Anđelković-Apostolović M, Paunović K, Cvetković M, Veličković-Radovanović R: **Association between parameters of mineral bone metabolism and survival in patients undergoing chronic hemodialysis.** *Acta medica Medianae* 2015, **54**(4):37-45.
321. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Juppner H *et al*: **Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis.** *The New England journal of medicine* 2008, **359**(6):584-592.
322. Scialla JJ, Xie H, Rahman M, Anderson AH, Isakova T, Ojo A, Zhang X, Nessel L, Hamano T, Grunwald JE *et al*: **Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2014, **25**(2):349-360.
323. Xie J, Yoon J, An SW, Kuro-o M, Huang CL: **Soluble Klotho Protects against Uremic Cardiomyopathy Independently of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate.** *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2015, **26**(5):1150-1160.
324. Zheng S, Zheng Y, Jin L, Zhou Z, Li Z: **Relationship between Serum Soluble Klotho Protein and Coronary Artery Calcification and Prognosis in Patients on Maintenance Hemodialysis.** *Iranian journal of public health* 2018, **47**(4):510-518.
325. Arnlov J, Carlsson AC, Sundstrom J, Ingelsson E, Larsson A, Lind L, Larsson TE: **Higher fibroblast growth factor-23 increases the risk of all-cause and cardiovascular mortality in the community.** *Kidney international* 2013, **83**(1):160-166.
326. Isakova T, Xie H, Yang W, Xie D, Anderson AH, Scialla J, Wahl P, Gutierrez OM, Steigerwalt S, He J *et al*: **Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease.** *Jama* 2011, **305**(23):2432-2439.
327. Qin Z, Liu X, Song M, Zhou Q, Yu J, Zhou B, Wu Y, He Y, Huang L: **Fibroblast growth factor 23 as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in prospective studies.** *Atherosclerosis* 2017, **261**:1-11.
328. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, Christenson RH, Vermeer C, Ketteler M, Shlipak MG, Whooley MA, Ix JH: **The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study.** *Annals of internal medicine* 2010, **152**(10):640-648.
329. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H *et al*: **Suppression of aging in mice by the hormone Klotho.** *Science (New York, NY)* 2005, **309**(5742):1829-1833.
330. Nowak A, Friedrich B, Artunc F, Serra AL, Breidthardt T, Twerenbold R, Peter M, Mueller C: **Prognostic value and link to atrial fibrillation of soluble Klotho and FGF23 in hemodialysis patients.** *PloS one* 2014, **9**(7):e100688.
331. Otani-Takei N, Masuda T, Akimoto T, Honma S, Watanabe Y, Shiizaki K, Miki T, Kusano E, Asano Y, Kuro OM *et al*: **Association between Serum Soluble Klotho Levels and Mortality in Chronic Hemodialysis Patients.** *International journal of endocrinology* 2015, **2015**:406269.
332. Marçais C, Maucort-Boulch D, Draï J, Dantony E, Carlier MC, Blond E, Genet L, Kuentz F, Lataillade D, Legrand E *et al*: **Circulating Klotho Associates With Cardiovascular Morbidity and Mortality During Hemodialysis.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2017, **102**(9):3154-3161.
333. Friedman DJ, Afkarian M, Tamez H, Bhan I, Isakova T, Wolf M, Ankers E, Ye J, Tonelli M, Zoccali C *et al*: **Klotho variants and chronic hemodialysis mortality.** *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2009, **24**(11):1847-1855.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Branislav Apostolović je Osnovnu školu završio u Surdulici, a Srednju medicinsku školu u Vranju kao „Praktičar generacije“. Medicinski fakultet u Nišu upisao školske 2003/2004. godine, a diplomirao je 6. jula 2010. godine, sa prosečnom ocenom 9,28/10, diplomskim radom na temu „Kasne komplikacije vezikoureteralnog refluksa kod dece“ na Katedri za Pedijatriju. Akademske doktorske studije molekularne medicine, upisao školske 2010/2011. godine na Medicinskom fakultetu u Nišu, od 2016. godine je na novom studijskom programu - medicinske nauke.

Po obavljenom lekarskom stažu položio je stručni ispit marta 2011. godine. Od 1. juna 2011. godine je zaposlen na Medicinskom fakultetu u Nišu, kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, rukovodioca prof. dr Dušice Pavlović. U istraživačko zvanje istraživač saradnik izabran 30.3.2016. godine. Od jula 2011. do jula 2017. godine učestvovao je u svakodnevnom kliničkom radu na Klinici za nefrologiju KC Niš, u okviru projekta Ministarstva. Od 01.07.2017. godine zaposlen u Kliničko bolničkom centru Zemun, Klinika za internu medicinu - Služba nefrologije. Od 19.10.2017. godine je na specijalizaciji iz Interne medicine, na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Tokom osnovnih studija u organizaciji IFMSA-Serbia, 2008. godine je mesec dana boravio u Specijalnoj bolnici za kardiovaskularne bolesti „Sveti Stefan“ na Ohridu. U skladu sa odlukom NN veća kojom se angažuju studenti DAS od oktobra 2011. do februara 2014. godine bio je angažovan kao saradnik u nastavi na Katedri za Biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu. Od decembra 2016. godine je istraživač na internom projektu Medicinskog fakulteta u Nišu, rukovodilac prof. dr Šaranac.

Osnivač i prvi urednik stručno-naučnog časopisa studenata Medicinskog fakulteta u Nišu „Studentski medicinski glasnik“, 2010. godine. Predsednik Centra za naučno-istraživački rad studenata (CNIRS) Medicinskog fakulteta u Nišu 2008-2011. godine. Član organizacionog odbora 48. i 49. Kongresa studenata medicinskih nauka Srbije, Kopaonik 2007. godine i Lepenski Vir 2008. Član Komisije za praćenje i unapređenje kvaliteta naučno-istraživačkog rada Medicinskog fakulteta u Nišu od 2009-2013. godine. Član je Udruženja nefrologa Srbije od 2014. godine, član Lekarske komore Srbije od 2013. godine i član Srpskog udruženja dijaliznih lekara od osnivanja.

Autor je i koautor većeg broja radova objavljenih u domaćim i stranim časopisima: 3 rada kategorije M23 (2 autorska), 3 rada kategorije M52 (1 autorski), 2 rada kategorije M53 (1 autorski), 4 rada kategorije M63 (1 autorski) i 18 radova kategorija M34 i 28 radova kategorija M64. Dr Apostolović ima nagrađen rad na Forumu mladih nefrologa 4. Kongresa nefrologa Srbije u organizaciji Udruženje nefrologa Srbije pod pokroviteljstvom ERA-EDTA, Beograd 2016. godine. Na Drugom međunarodnom kongresu kardioneфроlogije i hipertenzije u Nišu maja 2015. godine je nagrađen za najbolju poster prezentaciju rada. Imao je najbolji rad na sesiji Interna medicina na 49. i 50. Kongresu studenata medicinskih nauka Srbije, 2008. i 2009. godine.

Oženjen je, otac ćerke Petre.

IZABRANE PUBLIKACIJE AUTORA

1. **Apostolović B**, Cvetković T, Stefanović N, Apostolović S, Apostolović MA, Mitić B, Radovanović RV, Paunović K, Ignjatović A, Cvetković M, Stević N, Pavlović D. **The predictive value of *Klotho* polymorphism, in addition to classical markers of CKD-MBD, for left ventricular hypertrophy in haemodialysis patients.** Int Urol Nephrol 2019;51(8):1425-1433. DOI:10.1007/s11255-019-02193-3.
2. **Apostolović B**, Veličković-Radovanović R, Anđelković-Apostolović M, Cvetković T, Dinić M, Radiojević J. **Repeated *Burkholderiacepacia* Peritonitis in a Patient Undergoing Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis.** West Indian Med J 2015;64(3):288-90. DOI: 10.7727/wimj.2014.278.
3. Djordjevic S, Kitic D, Kostic M, **Apostolovic B**, Brankovic S, Mladenovic Ciric I, Velickovic-Radovanovic R. **Joint Influence of Protein Supplements, Soft Drinks and Extreme Physical Activity on the Development of Acute Renal Failure and Hypokalemia.** West Indian Med J 2017; 66(2):376–379. DOI:10.7727/wimj.2014.360
4. **Apostolović B**, Cvetković T, Apostolović MA, Paunović K, Cvetković M, Radovanović RV. **Assosiation between parameters of mineral bone metabolism and survival in patients undergoing chronic hemodialysis.** Acta Medica Medianae 2015; 54(4):37-45. DOI:10.5633/amm.2015.0406.
5. **Apostolović B**, Cvetković T, Paunović K, Stefanović N, Anđelković-Apostolović M, Apostolović S, Veličković-Radovanović R, Stević N. **Povezanost varijabilnosti na genu za *Klotho* protein i hipertrofije leve komore srca kod bolesnika na hemodijalizi.** 4. Kongres nefrologa Srbije 2016, Beograd. Knjiga sažetaka; 19. Nagrađeni rad.
6. **Apostolović B**, Cvetković T, Apostolović MA, Paunović K, Stefanović N, Stević N, Radovanović RV. **Predictive risk factors for cardiovascular mortality in hemodialysis patients.** 2th International Cardioneurology and Hypertension Congress. May 7-9, 2015. Nis, Serbia. Zbornik radova; 158-168. Nagrađeni rad.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**ПОВЕЗАНОСТ ВАРИЈАЦИЈА У ГЕНУ ЗА *KLOTNO* ПРОТЕИН,
ПАРАМЕТАРА МИНЕРАЛНО-КОШТАНОГ МЕТАБОЛИЗМА И
ЕХОКАРДИОГРАФСКИХ КАРАКТЕРИСТИКА
КОД БОЛЕСНИКА НА ХЕМОДИЈАЛИЗИ**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:

Др Бранислав Љ. Апостоловић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ПОВЕЗАНОСТ ВАРИЈАЦИЈА У ГЕНУ ЗА *KLOTNO* ПРОТЕИН,
ПАРАМЕТАРА МИНЕРАЛНО-КОШТАНОГ МЕТАБОЛИЗМА И
ЕХОКАРДИОГРАФСКИХ КАРАКТЕРИСТИКА
КОД БОЛЕСНИКА НА ХЕМОДИЈАЛИЗИ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:

Др Бранислав Љ. Апостоловић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**ПОВЕЗАНОСТ ВАРИЈАЦИЈА У ГЕНУ ЗА *KLOTNO* ПРОТЕИН,
ПАРАМЕТАРА МИНЕРАЛНО-КОШТАНОГ МЕТАБОЛИЗМА И
ЕХОКАРДИОГРАФСКИХ КАРАКТЕРИСТИКА
КОД БОЛЕСНИКА НА ХЕМОДИЈАЛИЗИ**

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____.

Потпис аутора дисертације:

Др Бранислав Љ. Апостоловић